

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler
(Direktor: Prof. Dr. E. Maser)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**PROTEKTIVE WIRKUNG AUSGEWÄHLTER PFLANZLICHER
POLYPHENOLE GEGEN OXIDATIVEN STRESS:
UNTERSUCHUNGEN AN C6 RATTENGLIOMZELLEN IN VITRO**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MARIA KUZIW
aus Königshütte

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Maser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herdegen

Tag der mündlichen Prüfung: 31. August 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31. August 2009

gez.: Prof. Dr. Rose-John

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Literaturverzeichnis

LITERATURVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN.....	III
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	5
2.1 Zellkultur	5
2.1.1 C6-Zellen.....	5
2.1.2 Materialien.....	5
2.1.3 Kulturmedien.....	6
2.1.4 Lösungen.....	7
2.1.5 Kultivierung	7
2.2 Testsubstanzen	8
2.3 Versuchsaufbau	9
2.3.1 96-Well-Mikrotiterplatten.....	9
2.3.1.1 Aussaat	10
2.3.1.2 Exposition	10
2.3.1.3 Messung.....	12
2.3.2 24-Well-Gewebekulturplatten	12
2.3.2.1 Aussaat	12
2.3.2.2 Exposition	12
2.3.2.3 Messung.....	14
2.4 Messmethoden	14
2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry	14
2.4.1.1 Material und Lösungen	14
2.4.1.2 Durchführung.....	15
2.4.2 Thiobarbiturat-Test	16
2.4.2.1 Material und Lösungen	17
2.4.2.2 Durchführung.....	17

2.4.3 MTT-Test.....	18
2.4.3.1 Material und Lösungen.....	18
2.4.3.2 Durchführung.....	19
2.5 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	20
2.5.1 96-Well-Mikrotiterplatten.....	20
2.5.2 24-Well-Gewebekulturplatten	20
2.5.2.1 Thiobarbiturat-Test.....	20
2.5.2.2 MTT-Test	20
3 ERGEBNISSE	22
3.1 Zytotoxische Wirkung von CHP und H₂O₂	22
3.2 Zytotoxische und zytoprotektive Wirkung von Polyphenolen	23
3.2.1 Wirkung von Quercetin	23
3.2.2 Wirkung von Galangin.....	26
3.2.3 Wirkung von Taxifolin.....	28
3.2.4 Wirkung von Resveratrol	30
3.2.5 Wirkung von Genistein.....	32
3.2.6 Wirkung von (+)-Catechin.....	32
3.2.7 Wirkung der Polyphenole im Vergleich	34
3.3 Einfluss von Polyphenolen auf die durch CHP induzierte Lipidperoxidation.....	35
4 DISKUSSION	39
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	48
6 LITERATURVERZEICHNIS	50
7 DANKSAGUNG.....	55
8 LEBENS LAUF.....	56

Abkürzungen

BSA	= Bovines Serum Albumin
CHP	= Cumolhydroperoxid
DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	= Dimethylformamid
EC	= Effective Concentration (EC ₅₀ : Konzentration einer Testsubstanz, die zu einer 50 %igen Reduktion des betrachteten Messparameters gegenüber der Kontrollgruppe führt)
FBS	= Fötales Bovines Serum
GSH	= Glutathion
H ₂ O ₂	= Wasserstoffperoxid
MDA	= Malondialdehyd
MTT	= (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
PBS	= Phosphate Buffered Saline nach Dulbecco
SEM	= Standard Error of the Mean (mittlerer Standardfehler)
TBA	= Thiobarbitursäure
TBARS	= Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TCA	= Trichloressigsäure
TEAC	= Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

1 Einleitung

Oxidativer Stress spielt als Mechanismus eine entscheidende Rolle in zahlreichen pathologischen Prozessen. So ist die oxidative Schädigung von LDL ein wichtiger Baustein in der Genese der Atherosklerose und somit kardiovaskulärer Erkrankungen (Halliwell, 1996; Willett, 1994). Die toxische Wirkung von Radikalen ist auch an der Entstehung von Krebs und altersassoziierten Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson beteiligt (Halliwell, 1996).

Radikale entstehen in biologischen Systemen im Rahmen von Autooxidationsvorgängen oder beim Metabolismus einer Reihe von Molekülen natürlichen oder synthetischen Ursprungs. So werden durch die schrittweise Reduktion des Sauerstoffs reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, zu denen das Superoxidradikalanion ($\cdot\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) gezählt werden. Während das Hydroxylradikal äußerst reaktiv ist, sind das Superoxidradikalanion und H_2O_2 reaktionsträge. Jedoch sind Übergänge zwischen den einzelnen Sauerstoffspezies möglich. So postulierten bereits 1934 Haber und Weiß die durch Übergangsmetalle wie Eisen oder Kupfer katalysierte Reaktion zwischen Superoxidradikalanionen und H_2O_2 , bei der Hydroxylradikale entstehen:

1. $\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
2. $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ (Fenton Reaktion)

Prinzipiell können Radikale mit allen Molekülen reagieren. Die Interaktion mit DNA kann zu Strangbrüchen und somit Fehlpaarungen sowie Mutationen führen. Diese Vorgänge können Apoptose oder eine Tumorentstehung bzw. -promotion induzieren. Aminosäuren können oxidativ geschädigt werden, so dass die physiologischen Funktionen von Enzymen, Rezeptoren und Strukturproteinen verloren gehen. Die Wechselwirkung freier Radikale mit Lipiden kann eine oxidative Kettenreaktion in Gang setzen. Dieser als Lipidperoxidation bezeichnete Prozess kann Membranstrukturen zerstören, Mitochondrien lysieren, hydrolytische Enzyme aus Lysosomen freisetzen und die Funktion membrangebundener Proteine beeinträchtigen.

Dem Organismus stehen zahlreiche enzymatische oder nicht-enzymatische Schutzsysteme zur Verfügung, die in der Lage sind, Radikale zu eliminieren. Zu

diesen zählen die Superoxiddismutasen, die Katalase und die Glutathionperoxidasen sowie Glutathion (GSH) und die Vitamine C und E als nichtenzymatische Vertreter. Wird jedoch die Kapazität dieser Systeme überschritten, entsteht oxidativer Stress. Zahlreiche epidemiologische Studien belegen, dass ein hoher Konsum von Obst und Gemüse vor Krebs, kardiovaskulären und altersassoziierten Erkrankungen schützt (Willett, 1994).

Dieser Effekt wird sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie den Polyphenolen zugeschrieben, zu denen das Hydroxystilben Resveratrol und die Flavonoide gerechnet werden. Resveratrol, welches in hohen Konzentrationen besonders in Traubenschalen zu finden ist, rückte in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses als mögliche Erklärung des „französischen Paradoxon“ (Sun et al., 2002). Die deutlich geringere Inzidenz von Herzinfarkten in Frankreich trotz einer cholesterinreichen Kost wurde auf den hohen Konsum von Rotwein zurückgeführt. Tatsächlich konnten in vitro Studien die antioxidativen Eigenschaften des Hydroxystilbens belegen (King et al., 2005). Resveratrol erwies sich auch als wirksamer Inhibitor der Karzinogenese (Jang et al., 1997). Darüber hinaus besitzt Resveratrol in niederen Organismen eine lebensverlängernde Wirkung, die bis jetzt nur für eine Kalorienrestriktion experimentell belegt war (Baur und Sinclair, 2006).

Tabelle 1 Eingruppierung der Polyphenole und ihr Vorkommen

Polyphenol	Gruppe	Vorkommen*
Galangin	Flavonol	Propolis, Galgantwurzel
Quercetin	Flavonol	Äpfel, Weintrauben, Zwiebeln
Taxifolin	Flavanon	Ginkgo, Zitrusfrüchte
(+)-Catechin	Flavanol	Tee, Weintrauben
Genistein	Isoflavonoid	Sojabohnen, Rotklee
Resveratrol	Hydroxystilben	Weintrauben, Himbeeren, Maulbeeren

* entnommen aus Bestwick und Milne (2006); Rice-Evans et al. (1997); Russo (2007); Watzl und Rechkemmer (2001)

Auch für Flavonoide konnte in experimentellen Studien eine Vielzahl von Effekten aufgedeckt werden. Sie wirken unter anderem antiviral, antiinflammatorisch, vasodilatierend, neuroprotektiv, antioxidativ und antimutagen (Cotelle, 2001; Klein

und King, 2007; Mercer et al., 2005). Flavonoide sind die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole (*Tab.1*) (Watzl und Rechkemmer, 2001). Es sind mehr als 8000 verschiedene Substanzen bekannt (Cotelle, 2001). Die strukturelle Vielfalt wird durch Modifikationen am Grundgerüst, welches aus zwei aromatischen und einem o-heterozyklischen Ring besteht, bedingt. Anhand der strukturellen Unterschiede werden Flavonoide in sechs Gruppen eingeteilt: Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavonoide.

Auf molekularer Ebene entfalten Polyphenole ihre Wirkung zum einen durch direkte Interaktion mit Enzymen. So sind sie zum Beispiel in der Lage, die Myeloperoxidase der neutrophilen Granulozyten, die Xanthinoxidase, die Cyclooxygenase und Phase 1 Enzyme zu hemmen, während sie wiederum Phase 2 Enzyme induzieren können (Cotelle, 2001; Jang et al., 1997; Russo, 2007). Zum anderen können Polyphenole auf Grund der zahlreichen Hydroxylgruppen Radikale direkt abfangen. Vor allem in zellfreien in vitro Testsystemen erwiesen sie sich als effektivere Antioxidantien als Vitamin E (Rice-Evans et al., 1997). Dabei hängt die antioxidative Aktivität der einzelnen Polyphenole von ihrer Grundstruktur und der Modifikation durch Substituenten ab (Cos et al., 2001; Rice-Evans et al., 1997). Zur antioxidativen Wirkung trägt ebenfalls die Fähigkeit bei, Übergangsmetalle wie Eisen und Kupfer zu chelatieren, und somit die Generierung reaktiver Spezies in der Haber-Weiß-Reaktion zu unterbinden (Cotelle, 2001).

Auf Grund dieser günstigen Eigenschaften der Polyphenole erhofft man sich, diese Verbindungen in der Prävention und Therapie von Erkrankungen nutzen zu können. Solche Substanzen sollten idealerweise über eine große therapeutische Breite verfügen, die protektive Wirkung sollte also bereits bei niedrigen Konzentrationen auftreten, während toxische Effekte gar nicht oder erst in höheren Konzentrationen beobachtet werden sollten. Tatsächlich sind prooxidative Effekte und somit mögliche schädliche Wirkungen von Polyphenolen beschrieben (Cotelle, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte Polyphenole einerseits hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und andererseits hinsichtlich ihrer Zytoprotektivität gegenüber oxidativem Stress zu untersuchen. Oxidativer Stress wurde mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Cumolhydroperoxid (CHP) ausgelöst. Beide Peroxide werden in der durch Eisenionen katalysierten Fentonreaktion zu reaktiven Hydroxyl- bzw. Alkoxyradikalen aktiviert (Farber, 1994). Während H_2O_2 als hydrophile Substanz seine Wirkung an vielen Orten in der Zelle entfaltet, wirkt CHP, ein

organisches Hydroperoxid, auf Grund seiner Lipophilie hauptsächlich an der Zellmembran (Vroegop et al., 1995). So kann CHP im Gegensatz zu H_2O_2 Lipidperoxidation induzieren (Linden et al., 2008).

Zu den untersuchten Polyphenolen zählten das Hydroxystilben Resveratrol sowie die Flavonoide Quercetin, (+)-Catechin, Taxifolin, Galangin und Genistein, die auf Grund von strukturellen Unterschieden verschiedenen Untergruppierungen der Flavonoide angehören (*Tab. 1*). Die Auswahl der Flavonoide basierte unter anderem auf einer durch Cos et al. (2001) durchgeführten Studie. Zur Bestimmung der Zytotoxizität von 35 Flavonoiden erfolgten Versuche mit humanen Hautfibroblasten. Für die Messung der lipidperoxidationshemmenden Aktivität wurden Mikrosomen aus Rattenhepatozyten verwendet. Catechin und Galangin aber auch Taxifolin zeichneten sich hierbei durch ein besonders günstiges Wirkprofil aus. Quercetin und vor allem Genistein zeigten in der Studie hingegen hohe zytotoxische Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die toxischen als auch die protektiven Effekte der Polyphenole mit Hilfe des gleichen Testsystems untersucht. Hierfür wurden Kulturen von C6-Rattengliomzellen verwendet. Die Zytotoxizität wurde in Abwesenheit der Peroxide erfasst. Die zytoprotektive Wirkung der Antioxidantien wurde als Hemmung oder Verminderung der durch H_2O_2 oder CHP ausgelösten Zellschädigung aufgefasst. Zusätzlich wurde untersucht, ob Quercetin, Taxifolin und Galangin Lipidperoxidation inhibieren können.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 C6-Zellen

Die C6-Zelllinie wurde aus einem Rattengliazelltumor, der durch N-Nitrosomethylharnstoff induziert wurde, von Benda et al. (1968) gewonnen. Die Gliomzelllinie wurde am 12.10.1999 in der 37. Passage von der American Type Culture Collection [ATCC Katalognr. CCL-107] bezogen, dreimal passagiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 44 bis 60 verwendet.

2.1.2 Materialien

Ham's F10 Nutrient Mixture	[Gibco]
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	[c.c.pro:PM-25-S]
mit 4,5 g Glucose/l, mit Pyruvat, mit Phenolrot	
DMEM mit 4,5 g Glucose/l, ohne Pyruvat, mit Phenolrot	[c.c.pro:PM-13-S]
FBS (Fötales Bovines Serum)	[Gibco]
HS (Pferdeserum)	[Gibco]
HEPES ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)	[Merck]
Glutamin (200 mM)	[c.c.pro]
Gentamycin (10 mg/ml)	[Gibco]
Fungizone (Amphotericin B 250 µg/ml)	[Gibco]
Trypsin EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	[Gibco]
Trypanblau	[Sigma]
25 cm ² Kulturflaschen	[Sarstedt]
Thomazählkammer	
96-Well-Mikrotiterplatten	[Falcon]
24-Well-Gewebekulturplatten	[Falcon]

2.1.3 Kulturmedien

- Erhaltungsmedium

Ham's F10 Pulver wurde unter Zugabe von 2,0 g NaHCO_3 und 5 ml Glutaminlösung (200 mM) in 900 ml ultra pure H_2O gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 und der Auffüllung auf 1000 ml mit ultra pure H_2O wurde die Lösung steril filtriert.

Zusammensetzung des Erhaltungsmediums (Vol.%) :

Ham's F10	81 %
Pferdeserum	15 %
FBS	2,5 %
Gentamycin (10 mg/ml)	1,0 %
Fungizone (250 $\mu\text{g/ml}$)	0,5 %

- Versuchsmedien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g Glucose/l und Phenolrot wurde zusammen mit 2,0 g NaHCO_3 und 4,768 g HEPES in ca. 900 ml ultra pure H_2O aufgelöst. Für die Versuche zur Lipidperoxidation wurde phenolrotfreies Medium verwendet, welches ohne HEPES angesetzt worden ist.

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 und der Auffüllung auf 1000 ml mit ultra pure H_2O wurde die Lösung steril filtriert.

Zusammensetzung des serumhaltigen Versuchsmediums (Vol.%):

DMEM mit Pyruvat	93,5 %
FBS	5,0 %
Gentamycin (10 mg/ml)	1,0 %
Fungizone (250 $\mu\text{g/ml}$)	0,5 %

Zusammensetzung des serumfreien Versuchsmediums (Vol.%):

DMEM ohne Pyruvat	98,5 %
a) mit Phenolrot (Versuche zur Zytotoxizität)	
b) ohne Phenolrot (Versuche zur Lipidperoxidation)	
Gentamycin (10 mg/ml)	1,0 %
Fungizone (250 $\mu\text{g/ml}$)	0,5 %

2.1.4 Lösungen

- PBS nach Dulbecco (Phosphate buffered saline)

NaCl 8000 mg/l

KCl 200 mg/l

Na₂HPO₄ 1150 mg/l

KH₂PO₄ 200 mg/l

Nach Kontrolle des pH-Wertes (7,4) wurde die Lösung steril filtriert.

Alle Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

2.1.5 Kultivierung

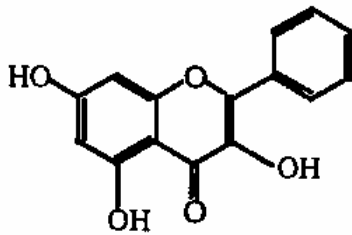
Die C6-Gliomzellen wurden in 25 cm² Flaschen bei 37°C im Begasungsbrutschrank (5 % CO₂) kultiviert. Als Erhaltungsmedium diente Ham's F10, welches am 4. und 7. Kulturtag ersetzt worden ist.

Einmal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde zunächst das Erhaltungsmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Durch das Hinzufügen von 5 ml Trypsin EDTA Lösung (1:10 mit PBS verdünnt) für 30 sec sowie die folgende fünfminütige Inkubation bei 37°C löste sich der Zellrasen vom Flaschenboden. Anschließend entstand durch die Zugabe von 5 ml serumhaltigem Versuchsmedium mittels Auf- und Abpipettieren eine homogene Zellsuspension. Um neue Erhaltungskulturen herzustellen, wurden neue Kulturflaschen mit jeweils 300 µl Zellsuspension sowie 7 ml Erhaltungsmedium befüllt.

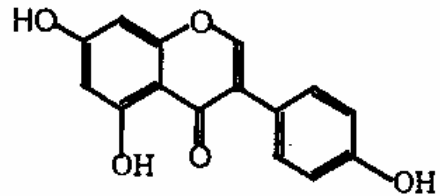
Um die gewünschte Zellkonzentration für die Aussaat in 96-Well-Platten (20.000 Zellen/Well) bzw. 24-Well-Platten (200.000 Zellen/Well) zu erhalten, wurden die suspendierten Zellen mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer ausgezählt, wobei die mittels einer Trypanblaufärbung kenntlich gemachten toten Zellen nicht in die Rechnung mit eingingen. Nach der Auszählung konnte die nötige Verdünnung der Zellsuspension mit dem serumhaltigen Versuchsmedium ermittelt werden.

2.2 Testsubstanzen

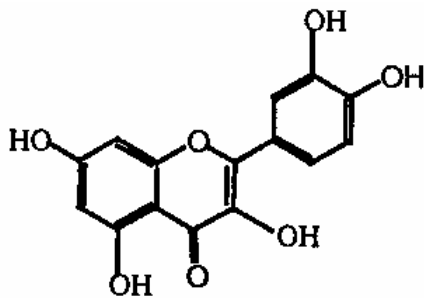
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 Gew.-% Lösung in Wasser [Aldrich]
- Cumolhydroperoxid (CHP) Luperox CU 90 88 % [Aldrich]
- Polyphenole: [Sigma]



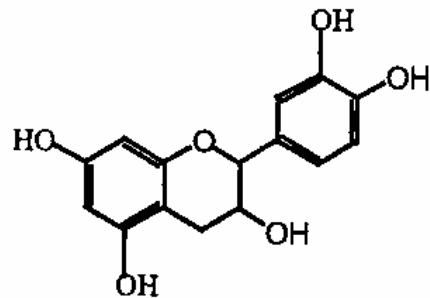
Galangin



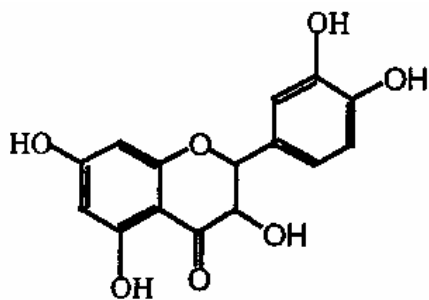
Genistein



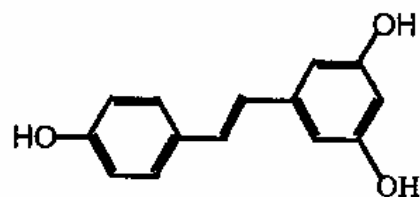
Quercetin



(+)-Catechin



Taxifolin



Resveratrol

Alle Polyphenole wurden lichtgeschützt aufbewahrt. Quercetin wurde im Kühlschrank, Galangin bei Raumtemperatur und die restlichen Antioxidantien bei -20°C gelagert. CHP wurde im Kühlschrank und H_2O_2 bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Abb. 1 Schematische Darstellung eines Versuchsablaufs in 96-Well-Mikrotiterplatten

2.3.1.1 Aussaat

Am ersten Tag wurden die 96-Well-Platten mit jeweils 200 µl Medium pro Well befüllt, wobei die äußeren Wells nur serumhaltiges Versuchsmedium enthielten und die inneren Wells (Spalten 3-10 und Zeilen B-G, *Abb. 2*) zusätzlich die im serumhaltigen Versuchsmedium suspendierten Zellen. Die Zellzahl betrug 20.000 Zellen pro Well. Nach der Aussaat wurden die Platten für 48 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.3.1.2 Exposition

Bevor am dritten Tag die Exposition mit den zu untersuchenden Substanzen begann, wurden die Platten unter dem Mikroskop betrachtet, um zu beurteilen, ob die Zellen gleichmäßig gewachsen sind und um Kontaminationen auszuschließen. Mit Ausnahme von Genistein und (+)-Catechin wurden für jede Substanz zwei Versuchsprotokolle durchgeführt.

Das serumhaltige Medium wurde abgesaugt und die Wells zweimal mit serumfreien Versuchsmedium gespült, um das FBS zu entfernen. Anschließend wurden die inneren Wells (Spalten 3-10 und Zeilen B-G, *Abb. 2*) mit 200 µl/Well serumfreien Versuchsmedium mit der entsprechenden Konzentration der zu untersuchenden Substanz und/oder des Peroxids je nach Versuchsaufbau befüllt. Die äußeren Wells erhielten nur serumfreies Medium. Die Inkubationsdauer im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ betrug 24 Stunden.

- Versuchsprotokoll 1

Für einen Versuch wurden Zellen in drei 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Um die Zytotoxizität des Polyphenols zu untersuchen, erhielten die inneren Wells einer Platte (*Abb. 2*: T1-T6) mit Ausnahme der Kontrollwells (*Abb. 2*: K) serumfreies Medium mit sechs verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz. Pro Konzentration wurden sechs Wells befüllt. In den insgesamt zwölf Kontrollwells befand sich nur serumfreies Medium mit dem Lösungsmittel DMSO.

Die beiden anderen Platten dienten zur Beurteilung der zytoprotektiven Wirkung. Sie wurden nach gleichem Schema mit dem Antioxidans befüllt, wobei das Versuchsmedium, sowohl für die Testgruppe als auch für die Kontrollgruppe, zusätzlich 100 µM CHP oder 500 µM H₂O₂ enthielt (*Abb. 2*).

- Versuchsprotokoll 2

Es wurden vier 96-Well-Mikrotiterplatten pro Versuch und Peroxid benötigt.

Eine Platte diente der Untersuchung der zytotoxischen Potenz von CHP bzw. H_2O_2 . Abgesehen von den Kontrollwells enthielten die inneren Wells der Platte (*Abb. 2*: T1-6) serumfreies Versuchsmedium mit sechs verschiedenen Konzentrationen von CHP bzw. H_2O_2 (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M). Pro Konzentration wurden sechs Wells befüllt. In den Kontrollwells (*Abb. 2*: K) befand sich nur serumfreies Versuchsmedium.

Die übrigen drei Platten wurden auf die gleiche Weise befüllt. In das Versuchsmedium wurde aber zusätzlich zum Peroxid das zu untersuchende Antioxidans hinzugefügt (eine Konzentration pro Platte). Anhand der Ergebnisse des Protokolls 1 wurden hierfür drei Konzentrationen des Polyphenols ausgesucht, die nach Möglichkeit im zytoprotektiven, jedoch noch nicht im zytotoxischen Bereich lagen. Die Kontrollwells erhielten serumfreies Versuchsmedium mit dem Antioxidans aber ohne Peroxid (*Abb. 2*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	S3									S3	BL
B	BL	S3	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	S3	BL
C	BL	S4	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	S4	BL
D	BL	S4	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	S4	BL
E	S1	S5	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	S5	S1
F	S1	S5	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	S5	S1
G	S2	S6	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	S6	S2
H	S2	S6									S6	S2

Abb. 2 Inkubationsschema für 96-Well-Mikrotiterplatten

BL: Blindwerte

S: Proteinstandards

K: Kontrollgruppe, Versuchsprotokoll 1: Versuchsmedium mit oder ohne Peroxid
Versuchsprotokoll 2: Versuchsmedium mit oder ohne Antioxidans

T: Testgruppe, T1 niedrigste Konzentration des Antioxidans bzw. des Peroxids
T6 höchste Konzentration des Antioxidans bzw. des Peroxids

2.3.1.3 Messung

Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden nach Ende der 24stündigen Inkubation aus dem Brutschrank geholt und unter dem Mikroskop beurteilt. Danach wurde der Proteingehalt in den Wells mit der Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt.

2.3.2 24-Well-Gewebekulturplatten

Es wurden zwei 24-Well-Platten pro Versuch benötigt. In einer Platte wurde die Wirkung jeweils eines ausgewählten Polyphenols auf die durch CHP ausgelöste Lipidperoxidation untersucht (Thiobarbiturat-Test). In der zweiten Platte wurde ein Versuch zur Zytoprotektivität des jeweiligen Antioxidans bei gleichzeitiger Inkubation mit CHP durchgeführt (MTT-Test).

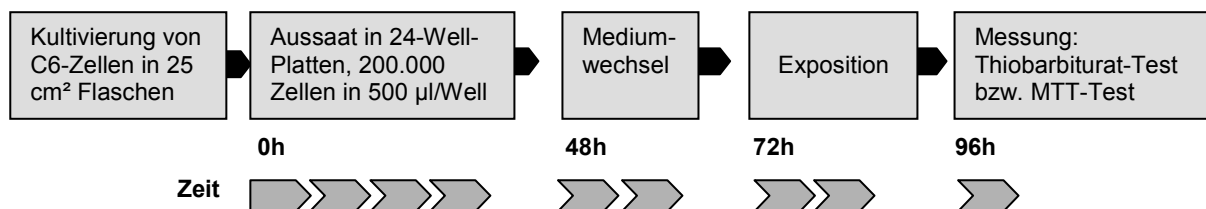


Abb. 3 Schematische Darstellung eines Versuchsablaufs in 24-Well-Gewebekulturplatten

2.3.2.1 Aussaat

Am ersten Tag wurden die C6-Gliomzellen in die 24-Well-Gewebekulturplatten ausgesät. Nur die Wells A1-3 der Platten für den MTT-Test erhielten zellfreies Medium, da diese später zur Leerwertbestimmung benutzt worden sind. Die anderen Wells wurden alle mit je 200.000 Zellen in 500 µl serumhaltigen Medium befüllt. Die Platten wurden für 72 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei nach 48 h das Medium durch frisches serumhaltiges Versuchsmedium ersetzt worden ist.

2.3.2.2 Exposition

Bevor am 4.Tag mit der Exposition begonnen wurde, wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, um sicher zu gehen, dass sie gleichmäßig gewachsen sind

und nicht kontaminiert waren. Danach wurden alle Wells zweimal mit 400 µl serumfreien Versuchsmedium gespült, um alles FBS zu entfernen.

Sowohl die Platten für die Messung der Lipidperoxidation als auch die Platten für den MTT-Test wurden nach gleichem Schema befüllt (*Abb. 4*).

Die Wells A1-3 erhielten 600 µl serumfreies Versuchsmedium pro Well. In den Versuchen zur Lipidperoxidation dienten die Kulturen dieser Wells zur Bestimmung des Proteingehaltes pro Well (Proteinbestimmung nach Lowry). In den Versuchen zur Zytotoxizität wurden die zellfreien Wells A1-3 als Leerwerte für den MTT-Test genutzt.

Die Wells B1-3 wurden ebenfalls nur mit serumfreiem Versuchsmedium (600 µl/Well) befüllt. Sie dienen als Kontrollen für das Maß der Lipidperoxidation bzw. der Zellvitalität in Abwesenheit von CHP und der zu untersuchenden Polyphenole.

In den Wells C1-3 wurde die durch CHP induzierte Lipidperoxidation bzw. Zytotoxizität untersucht. Daher erhielten sie 600 µl serumfreies Versuchsmedium mit CHP (500 µM).

In den übrigen Wells enthielt das serumfreie Medium zusätzlich zum CHP auch ein Antioxidans. Es wurden jeweils drei Wells mit der gleichen Konzentration eines Polyphenols befüllt, so dass pro Platte fünf verschiedene Konzentrationen untersucht werden konnten.

Nach dem Befüllen wurden die 24-Well-Gewebekulturplatten für 24 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

	1	2	3	4	5	6
A	L	L	L	T3	T3	T3
B	K	K	K	T4	T4	T4
C	T1	T1	T1	T5	T5	T5
D	T2	T2	T2	T6	T6	T6

Abb. 4 Inkubationsschema für 24-Well-Gewebekulturplatten

L: Leerwert / Proteinwert

K: Kontrollgruppen

T: Testgruppen T1: CHP

T2-T6: CHP + Antioxidans (T2 niedrigste, T6 höchste Konzentration)

2.3.2.3 Messung

Nach 24 h Exposition wurden die Platten zunächst unter dem Mikroskop betrachtet. Danach begann die Messung der Lipidperoxidation mit dem Thiobarbiturat-Test und die Messung der Zytotoxizität bzw. der Zytoprotektivität mit dem MTT-Test. Der Proteingehalt der Wells A1-3 der Lipidperoxidationsplatte wurde mit der Methode nach Lowry bestimmt.

2.4 Messmethoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Als Parameter für vitale Zellen diene der Gehalt an Zellprotein in den Wells, der mittels der Methode nach Lowry et al. (1951) bestimmt worden ist.

Hierbei wird zunächst die Biuret-Reaktion, bei der in Anwesenheit von Kupfersulfat und Peptiden oder Proteinen im alkalischen Milieu Kupfer-Protein-Komplexe entstehen, durchgeführt. Durch Hinzugabe von Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, einer Lösung von Natriumwolframat und –molybdat sowie Phosphor- und Salzsäure, entsteht eine konzentrationsabhängige Blaufärbung, die auf der Reduktion von Wolframat und Molybdat durch Proteine, d.h. im wesentlichen Tyrosin und Tryptophan und im geringeren Ausmaß Cystin, Cystein und Histidin, basiert. Der Biuret-Komplex erleichtert diese Reaktion.

Die Extinktion wurde photometrisch bei 630 nm gemessen. Bovines Serumalbumin (BSA) diene der Erstellung einer Eichkurve zur Quantifizierung des Proteingehalts.

2.4.1.1 Material und Lösungen

- PBS nach Dulbecco (Phosphate buffered saline) mit Ca/Mg

Lösung A:	NaCl	8000 mg/l
	KCl	200 mg/l
	Na ₂ HPO ₄	1150 mg/l
	KH ₂ PO ₄	200 mg/l
Lösung B:	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/l
	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	132 mg/l

Lösungen A und B wurden getrennt angesetzt (Lösung A in 800 ml ultra pure H₂O, Lösung B in 100 ml ultra pure H₂O) und anschließend vorsichtig zusammengegossen. Nach Kontrolle des pH-Wertes wurde auf 1000 ml mit ultra pure H₂O aufgefüllt.

- Biuret-Lösung

4% Na₂CO₃ in ultra pure H₂O

2% K-Na-Tatrat in ultra pure H₂O

1% CuSO₄ x 5 H₂O in ultra pure H₂O

Zu 48 Teilen der Na₂CO₃-Lsg. wurde zuerst 1 Teil K-Na-Tatrat-Lsg. und danach 1 Teil CuSO₄-Lsg. frisch am Messtag hinzugefügt.

- Folin-Lösung

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz [Merck] wurde 1:2 mit ultra pure H₂O verdünnt.

- BSA-Standardproben

BSA (Bovines Serum Albumin) [Sigma]

Zur Herstellung der Stammlösung wurden zunächst 20 mg BSA in 5 ml ultra pure H₂O gelöst und danach 5 ml 1 N NaOH hinzugefügt. Mittels Verdünnung durch 0,5 N NaOH entstanden sechs verschiedene Konzentrationen, wobei die des höchsten Standards 0,4 mg BSA/ml und die des niedrigsten 0,025 mg BSA/ml betrug. Die Proteinstandards wurden portionsweise in Eppendorfhütchen bei -20°C eingefroren und die benötigte Menge am Messtag aufgetaut.

2.4.1.2 Durchführung

- 96-Well-Mikrotiterplatten

Als erstes wurde das Versuchsmedium in allen Wells abgesaugt und diese wurden anschließend dreimal mit 200 µl PBS-Puffer mit Calcium und Magnesium gespült. Danach wurden die Wells der Spalten 3-10 mit je 60 µl 0,5 N NaOH befüllt. Es folgte eine 45-minütige Durchmischung auf dem Shaker-Inkubator bei 37°C.

Als nächstes erhielten die zellfreien Wells 1 A-D und 12 A-D, die zur Blindwertbestimmung dienten, ebenfalls 60 µl 0,5 N NaOH/ Well. Die restlichen Wells der Spalten 1, 2 , 11 und 12 wurden mit je 60 µl der in NaOH gelösten Proteinstandards befüllt, wobei pro Platte 4 Wells die gleiche Konzentration enthielten (*Abb. 2*). Des Weiteren wurde in jedes Well 150 µl Biuretlösung pipettiert und die Platten danach wieder für 10 Minuten auf den Shaker-Inkubator gestellt.

Zum Schluss wurde in jedes Well 60 µl Folinlösung hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren alles gut vermischt.

Nach weiteren 20 Minuten auf dem Shaker-Inkubator konnte die Extinktion der gebildeten blauen Farbe bei 630 nm im Mikrotiterplattenphotometer (BIO-TEK Elx800uv) gemessen werden. Mit Hilfe der aus den Proteinstandards ermittelten Eichgerade konnte die Proteinmenge quantifiziert werden.

- 24-Well-Gewebekulturplatten

Nach dem Absaugen des Versuchsmediums wurden die Wells A1-3 der Lipidperoxidationsplatte dreimal mit PBS mit Ca/Mg gespült. Dann wurden die Zellen in je 500 µl NaOH/Well solubilisiert und in Eppendorfhütchen überführt. Diese wurden eingefroren, um die Proteinbestimmung zu einem späteren Zeitpunkt für alle 24-Well-Gewebekulturplatten durchzuführen.

Nach dem Auftauen wurde der Inhalt jedes Wells mit NaOH im Verhältnis 1:2 und 1:4 verdünnt, um sicher zu gehen, dass wenigstens eine Verdünnung im Bereich der Proteinstandards lag. Es folgte das Befüllen der inneren Wells von 96-Well-Mikrotiterplatten. In zwei Wells wurden je 60 µl unverdünntes Zellsolubilisat pipettiert und in je zwei weitere die gleichen Mengen der verdünnten Proben, so dass mit dem Inhalt eines Wells der 24-Platte insgesamt sechs Wells der 96-Platte befüllt worden sind.

Die äußeren Wells erhielten die Proteinstandards und 0,5 N NaOH zur Leerwertbestimmung. Dieser Schritt und die folgenden erfolgten analog dem oben bereits beschriebenen Vorgehen.

2.4.2 Thiobarbiturat-Test

Die Messung der Lipidperoxidation erfolgte mittels des Thiobarbiturat-Tests. Das unter anderem bei der Lipidperoxidation entstehende Malondialdehyd (MDA) reagiert im sauren Milieu (optimal: pH 2-3) unter Erhitzen (90-100°C) mit Thiobarbitursäure

(TBA) zu einem rosa Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 532-535 nm liegt (Draper und Hadley, 1990). Falls, wie hier, vor der TBA-Reaktion keine Trichloressigsäure-Fällung und Entfernung des Präzipitats durchgeführt und stattdessen die gesamte angesäuerte Gewebeprobe verwendet wird, so ist die Methode nicht spezifisch für freies MDA. MDA und MDA-ähnliche Verbindungen können während des Assays durch säurekatalysierte bzw. thermische Dekomposition aus Vorläufern entstehen, z. B. aus anderen Aldehyden, proteingebundenem MDA oder oxidierten Lipiden. Daher ist es in diesem Fall angemessener von der Messung TBA-reaktiver Substanzen (TBARS: thiobarbituric acid reactive substances) als von MDA-Messung zu sprechen. Unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten für den MDA/TBA-Komplex werden TBARS als MDA-Äquivalente ausgedrückt.

2.4.2.1 Material und Lösungen

- TBA/TCA Lösung

Es wurden zunächst 400 mg Thiobarbitursäure [TBA, Sigma] in 35 ml ultra pure H₂O gelöst. Anschließend wurden 10 g Trichloressigsäure [TCA, Merck] hinzugefügt. Die Lösung wurde mit ultra pure H₂O auf 50 ml aufgefüllt. Dies entsprach einem Anteil von 0,8 % TBA und 20 % TCA an der Lösung.

2.4.2.2 Durchführung

Bis auf die Wells A1-3 (Proteinbestimmung nach Lowry) erhielten alle übrigen Wells 600 µl TBA/TCA Lösung/Well. Mittels eines Gummispatels wurde der Zellrasen vom Boden gelöst. Anschließend wurde der Inhalt jedes Wells (Zellen, 600 µl serumfreies Versuchsmedium, 600 µl TBA/TCA Lösung) in ein Glasröhrchen überführt. Aus 2 ml TBA/TCA Lösung und 2 ml serumfreien Versuchsmedium wurde ebenfalls in einem Glasröhrchen eine Blindlösung hergestellt. Damit beim folgenden Erhitzen im Hitzeblock für 15 min bei 110°C der Inhalt der Röhrchen nicht verdunsten konnte, wurden diese mit Aluminiumfolie abgedeckt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15°C und 5000 g, so dass sich der gesamte Inhalt abkühlte und die Zellbestandteile in den Glasröhrchen zu Boden sanken. Der zellfreie Überstand wurde danach vorsichtig abpipettiert und in Halbmikroküvetten überführt. Anschließend konnte mit der Messung im Photometer bei 532 nm gegen die Blindlösung begonnen werden.

Die gemessenen Extinktionen wurden anhand folgender Formel in Malondialdehyd-Äquivalente (TBARS) umgerechnet:

$$\text{TBARS (mol/mg Zellprotein)} = \frac{\text{Extinktion} \times \text{Reaktionsvolumen (l/Well)}}{\text{E} \times \text{Zellprotein (mg/Well)}}$$

Das Reaktionvolumen betrug 1200 µl/Well. E ist der molare Extinktionskoeffizient bei 532 nm ($E = 1,49 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Draper und Hadley, 1990).

2.4.3 MTT-Test

Bei dem MTT-Test (Mosmann, 1983) handelt es sich um eine Vitalfärbung. Das Tetrazoliumsalz MTT wird von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zum violetten Formazan reduziert. Diese Reaktion kann also nur in lebenden Zellen ablaufen und ist somit eine einfache Messmethode zur Bestimmung des Anteils der vitalen Zellen einer Kultur. Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode ist an Hansen et al. (1989) angelehnt.

2.4.3.1 Material und Lösungen

DMEM mit 4,5 g Glucose/l, ohne Pyruvat, ohne Phenolrot	[c.c.pro: PM-21-S]
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	[Sigma]
DMF (Dimethylformamid)	[Merck]
Essigsäure	[Merck]
1 N HCl	[Merck]
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	[Merck]

- DMEM ohne Phenolrot, ohne Pyruvat (MTT-Medium)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g Glucose/l wurde zusammen mit 2,0 g NaHCO₃ und 4,768 g HEPES in ca. 900 ml ultra pure H₂O aufgelöst. Zusätzlich erhielt es 20 ml Glutamin (200 mM Lsg.) und 10 ml Na-Pyruvat (100 mM Lsg.). Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 und der Auffüllung auf 1000 ml mit ultra pure H₂O wurde die Lösung steril filtriert.

Zusammensetzung des Versuchsmediums (Vol.%):

DMEM ohne Pyruvat	98,5 %
Gentamycin (10 mg/ml)	1,0 %
Fungizone (250 µg/ml)	0,5 %

- MTT-Lösung

Es wurden 5 mg MTT pro 1 ml PBS gelöst und steril filtriert. Die Lösung wurde lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

- Solubilisierungslösung

Zuerst wurden 50 % DMF und 80 % Essigsäurelösung in ultra pure H₂O hergestellt. Danach wurden 20 g SDS in ca. 70 ml 50 %igem DMF gelöst und anschließend 2,5 ml 80 %ige Essigsäurelösung und 2,5 ml 1 N HCl hinzugefügt. Zuletzt wurde mit 50 %igem DMF auf 100 ml aufgefüllt.

Alle drei Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

2.4.3.2 Durchführung

Bevor die 24-Well-Gewebekulturplatte bearbeitet wurde, wurde sie unter dem Mikroskop betrachtet.

Zuerst wurde jedes Well mit je 500 µl MTT-Medium gespült. Danach erhielt jedes Well 500 µl MTT-Medium und 125 µl MTT-Lösung. Damit sich alles gut vermischte, wurde die Platte kurz auf den Shaker-Inkubator gestellt. Es folgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. In dieser Zeit entwickelte sich eine ausreichende Farbreaktion. Es folgte die Zugabe von 500 µl Solubilisierungslösung/Well. Nach 5 min auf dem Shaker-Inkubator wurde die Platte über Nacht in den Brutschrank gestellt.

Vor der photometrischen Messung am nächsten Tag wurde die Platte noch einmal für 5 min auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt und danach die Lösungen in den Wells mit einem Plastikspatel umgerührt. Die Extinktion wurde bei 570 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

2.5 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism in Form von Konzentrations-Wirkungskurven oder Balkendiagrammen. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert der Versuche mit der Spannweite (range) bei zwei Versuchen bzw. dem Standardfehler (SEM) ab mindestens n=3 Versuchen.

2.5.1 96-Well-Mikrotiterplatten

Der Wert der Kontrolle entspricht dem Mittelwert des Proteingehalts aus den zwölf unbehandelten Wells, die also weder ein Oxidans noch ein Polyphenol enthielten. Die Kontrolle wurde mit 100 % gleichgesetzt. Der Mittelwert des Proteingehalts der Testgruppen wurde aus den sechs Wells ermittelt, die die gleiche Konzentration des Oxidans und / oder des Polyphenols enthielten, und in % der Kontrolle ausgedrückt. Die EC₅₀-Werte, die der Konzentration des Peroxids entsprechen, bei der eine Reduktion des Proteingehalts um 50 % stattfand, wurden aus dem mittels des Programms Graph Pad Prism aufgezeichneten Kurvenverlaufs abgelesen.

Verschiedene Konzentrationen der Polyphenole wurden statistischen Analysen (t-Test für verbundene Stichproben) unterzogen, um zu klären, welche Konzentrationen signifikant ($p < 0.05$) toxisch wirken.

2.5.2 24-Well-Gewebekulturplatten

2.5.2.1 Thiobarbiturat-Test

Mit Hilfe der in 2.4.2.2 beschriebenen Formel wurden die gemessenen Extinktionen in TBARS (mol/mg Zellprotein) umgerechnet. Aus den Messwerten der drei Wells jeder Gruppe, die mit der gleichen Konzentration des Oxidans und Polyphenols behandelt wurden, wurde der Mittelwert gebildet.

2.5.2.2 MTT-Test

Als Kontrolle diente der Mittelwert der gemessenen Extinktionen aus den drei unbehandelten Wells B1-3, deren Versuchsmedium weder CHP noch ein Polyphenol enthielt. Dieser Wert entspricht 100 %. Der Mittelwert aus den Extinktionen der drei Wells jeder Gruppe, die Medium der gleichen Konzentration CHP und/oder eines Polyphenols erhalten hatten, wurde in % der Kontrolle ausgedrückt.

Die Ergebnisse des Thiobarbiturat- und des MTT-Tests wurden einer univariaten Varianzanalyse (one-way ANOVA) unterzogen. Bei signifikantem Ergebnis wurde als Post-Hoc-Test der Dunnett-Test durchgeführt. Ein Unterschied gilt als signifikant bei $p < 0.05$. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Graph Pad Prism Programms erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxische Wirkung von CHP und H₂O₂

Zur Auslösung von oxidativem Stress wurden in der vorliegenden Studie die beiden Peroxide CHP und H₂O₂ verwendet, die durch unterschiedliche Angriffsstellen in der Zelle charakterisiert sind. Während CHP seine Wirkung vorwiegend an der Zellmembran entfaltet, greift H₂O₂ intrazelluläre Strukturen an. CHP erwies sich als das potentere Peroxid in C6 Zellen. Wie in *Abbildung 5* dargestellt, wirkte CHP in geringeren Konzentrationen als H₂O₂ zytotoxisch. So führte eine Konzentration von $37,6 \pm 12,5 \mu\text{M}$ CHP (n=10) zu einer Reduktion des Proteingehaltes um 50 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, die einen Zellproteingehalt von $13,6 \pm 3,4 \mu\text{g/Well}$ (n=10) enthielten. Der EC₅₀-Wert von H₂O₂ hingegen betrug $146,8 \pm 54,9 \mu\text{M}$ (n=5), wobei die unbehandelten Kontrollwells einen Proteingehalt von $15,7 \pm 3,1 \mu\text{g/Well}$ aufwiesen.

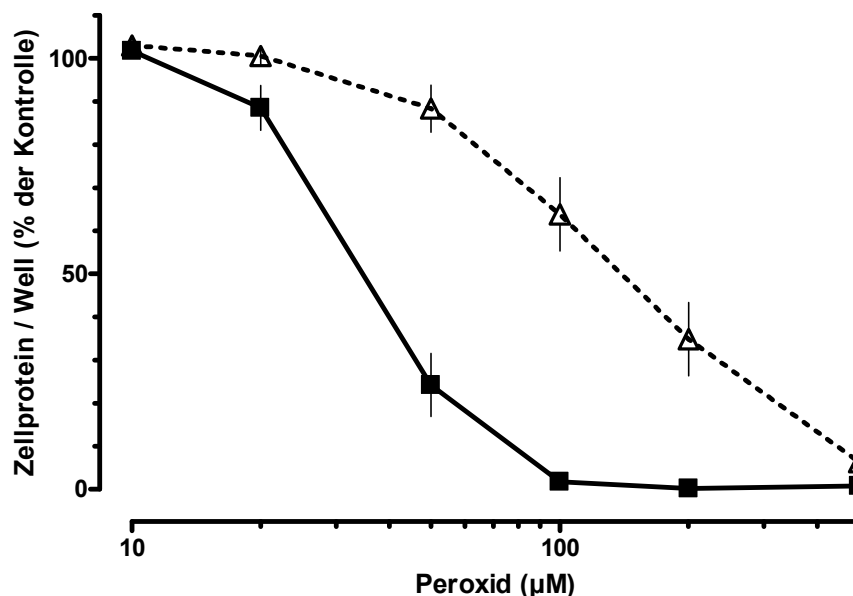


Abb. 5 Zytotoxische Wirkung der Peroxide CHP und H₂O₂
 Das Versuchsmedium enthielt (■) CHP bzw. (Δ) H₂O₂. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein Peroxid im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (CHP n=10, H₂O₂ n=5).

3.2 Zytotoxische und zytoprotektive Wirkung von Polyphenolen

3.2.1 Wirkung von Quercetin

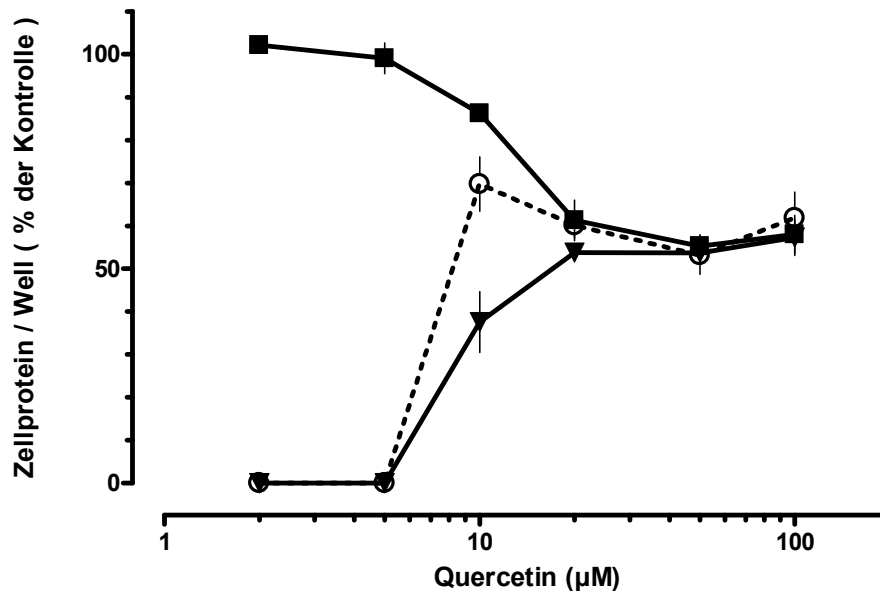


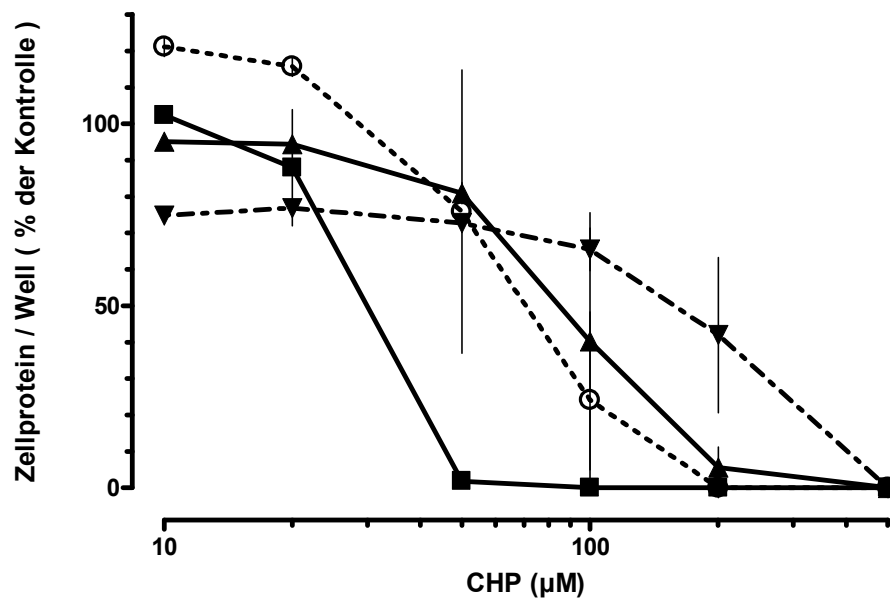
Abb. 6 Zytotoxische Wirkung von Quercetin und Zytoprotektion gegenüber Peroxiden
Das Versuchsmedium enthielt (■)Quercetin, (○)Quercetin und 100 µM CHP sowie (▼)Quercetin und 500 µM H₂O₂. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein Quercetin, kein Peroxid im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

Mit Hilfe des ersten Versuchsprotokolls wurde das Flavonoid Quercetin bezüglich seiner Zytotoxizität bzw. Zytoprotektivität gegenüber der Wirkung von Peroxiden untersucht, wobei zwei Versuche im Konzentrationsbereich von 2 bis 100 µM durchgeführt worden sind (Abb. 6).

Konzentrationen von 20 µM Quercetin wirkten signifikant zytotoxisch ($p < 0.05$, $n=4$). Ab einer Konzentration von 20 µM erreichte die Zytotoxizitätskurve ein Plateau, wobei der Verlust an Zellprotein ca. 50 % bezogen auf die Kontrolle betrug.

Da sich in vorhergehenden Versuchen gezeigt hatte, dass CHP eine höhere zytotoxische Potenz aufweist als H₂O₂, sind in diesem Versuchsprotokoll unterschiedliche Konzentrationen der beiden Peroxide verwendet worden: 100 µM bei CHP und 500 µM bei H₂O₂. In diesen Konzentrationen führten beide Peroxide zu einem vollständigen Verlust an Zellen nach einer Expositionsdauer von 24 h. Die

A



B

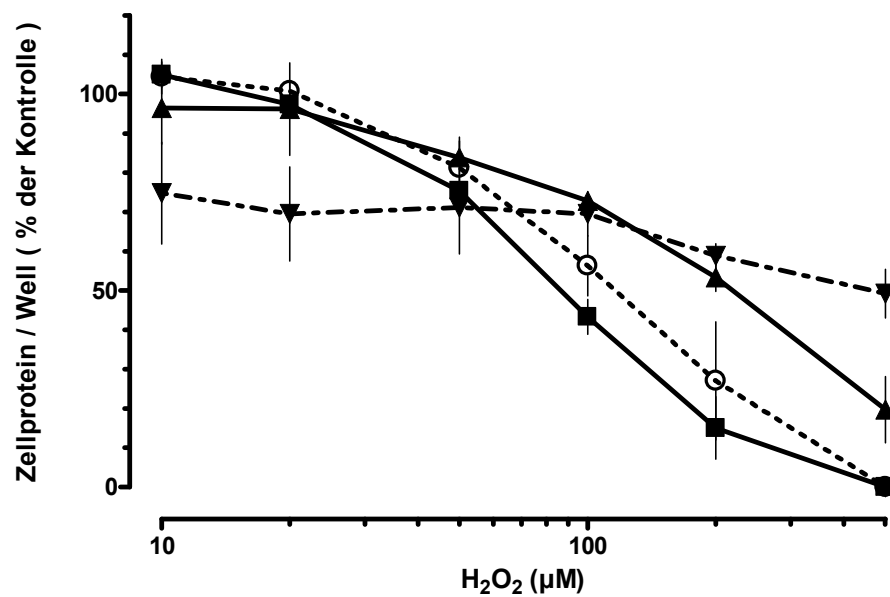


Abb. 7 Einfluss von Quercetin auf die zytotoxische Potenz von CHP (A) und H_2O_2 (B)

Das Versuchsmedium enthielt (■) kein Quercetin, (○) 5 μM Quercetin, (▲) 10 μM Quercetin und (▼) 20 μM Quercetin. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein Quercetin, kein CHP bzw. H_2O_2 im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

gleichzeitige Anwesenheit von Quercetin führte hingegen zu einem deutlichen Anstieg des Anteils vitaler Zellen gemessen als Zellprotein / Well (Abb. 6). Während bei 2 und 5 μM Quercetin noch kein Effekt zu erkennen war, zeigten höhere Konzentrationen eine eindeutige zytoprotektive Wirkung. Bei diesen Konzentrationen

überlebten ca. 50 % der Zellen die Behandlung mit beiden Peroxiden. Jedoch lässt *Abbildung 6* auch erkennen, dass eine Erhöhung der Quercetinkonzentration über 10 bzw. 20 μM hinaus keine weitere Steigerung der zytoprotektiven Wirkung auslösen kann, weil dieses Flavonoid in diesen Konzentrationen selbst zytotoxisch ist.

Um die zytoprotektive Potenz von Quercetin zu charakterisieren, sind Experimente nach dem Versuchsprotokoll 2 durchgeführt worden (s. 2.3.1). Hierbei wurde geprüft, ob und in welchem Ausmaß ausgewählte Konzentrationen des Polyphenols zu einer Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für CHP bzw. H_2O_2 führen können. Basierend auf den Ergebnissen des Versuchsprotokolls 1 wurden folgende Quercetin-Konzentrationen ausgewählt: 5 μM , 10 μM und 20 μM .

Abbildung 7 A zeigt, dass Quercetin zu einer deutlichen Verlagerung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von CHP zu höheren Konzentrationen führt, mit anderen Worten die Empfindlichkeit der C6-Zellen für die Wirkung des Peroxids vermindert. Diese zytoprotektive Wirkung des Quercetins ist konzentrationsabhängig. Während der EC_{50} -Wert für CHP in den Kontrollen im Mittel 30 μM betrug, lag er in Anwesenheit von 5 μM Quercetin bei 70 μM , von 10 μM bei 105 μM und bei 20 μM bei 190 μM . Somit verminderte Quercetin die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Wirkung von CHP um Faktoren von 2,3, 3,5 bzw. 6,3. Es ist allerdings zu bedenken, dass, wie bereits in den vorhergehenden Versuchen beobachtet (*Abb. 6*), 20 μM Quercetin selbst zu einem Zellverlust führte, also zytotoxisch wirkte.

Abbildung 7 B verdeutlicht die zytoprotektive Wirkung des Quercetin gegenüber H_2O_2 . Der EC_{50} -Wert für H_2O_2 in den Kontrollen lag im Mittel bei 87,5 μM . In Anwesenheit von Quercetin verlagerten sich die Kurven um Faktoren von 1,5 bei 5 μM Quercetin, 2,4 bei 10 μM Quercetin bzw. > 4,7 bei 20 μM Quercetin zu höheren Konzentrationen.

Auch in diesen Experimenten wirkte eine Konzentration von 20 μM Quercetin zytotoxisch.

3.2.2 Wirkung von Galangin

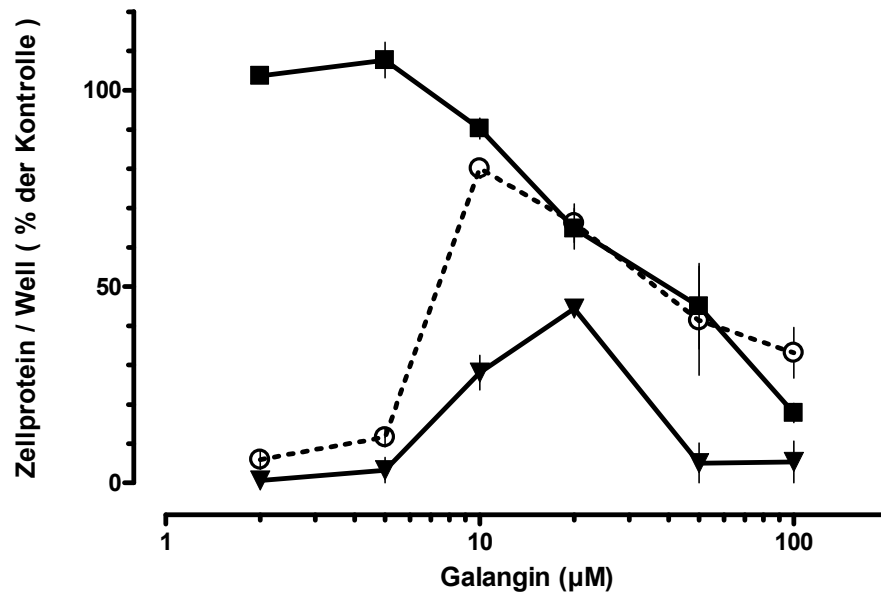


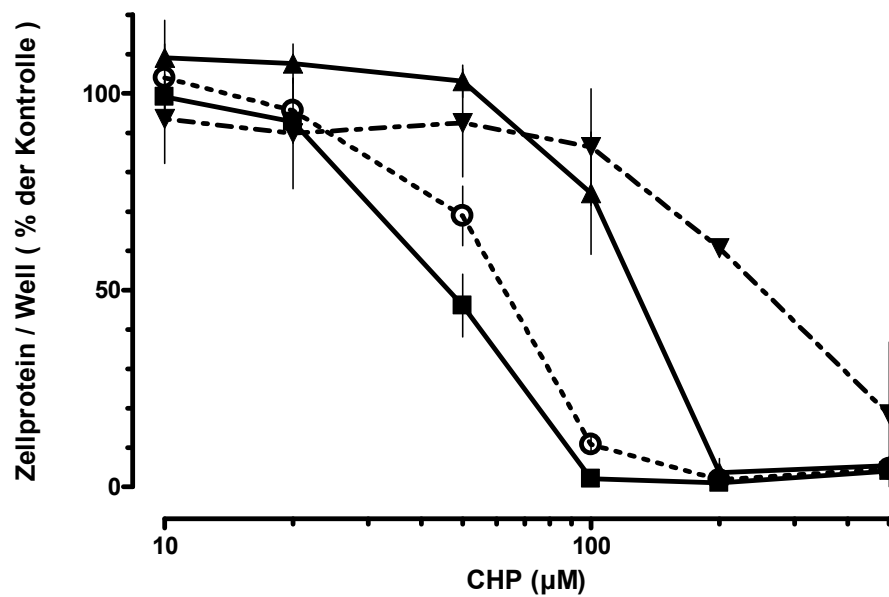
Abb. 8 Zytotoxische Wirkung von Galangin und Zytoprotektion gegenüber Peroxiden
Das Versuchsmedium enthielt (■) Galangin, (○) Galangin und 100 µM CHP sowie (▼) Galangin und 500 µM H₂O₂. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein Galangin, kein Peroxid im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

Das Flavonoid Galangin wurde im Konzentrationsbereich von 2 bis 100 µM untersucht. *Abbildung 8* stellt die Ergebnisse der Versuche zur Zytotoxizität und Zytoprotektion dieses Polyphenols dar. Eine signifikante zytotoxische Wirkung des Galangins ließ sich ab einer Konzentration von 10 µM beobachten ($p < 0.05$, $n=4$). Im Durchschnitt führte eine Konzentration von 42 µM zu einer Reduktion des Proteingehalts pro Well um 50 %.

Während die Inkubation mit den beiden Peroxiden CHP und H₂O₂ den kompletten Verust an C6-Gliomzellen bewirkte, konnte bei gleichzeitiger Anwesenheit von Galangin ein Anstieg des Zellproteins pro Well verzeichnet werden. Wie aus der *Abbildung 8* ersichtlich, erwies sich dabei das Flavonoid als wirksamer gegenüber dem zytotoxischen Effekt von CHP als gegenüber dem von H₂O₂.

Bei gleichzeitiger Exposition mit Galangin und CHP lag die maximale zytoprotektive Potenz bereits bei einer Konzentration von 10 µM Galangin, wobei ein Anstieg des Zellproteins pro Well auf durchschnittlich 83 % gemessen wurde. Bei gleichzeitiger Inkubation mit H₂O₂ hingegen erreichte die Dosis-Wirkungskurve erst bei 20 µM

A



B

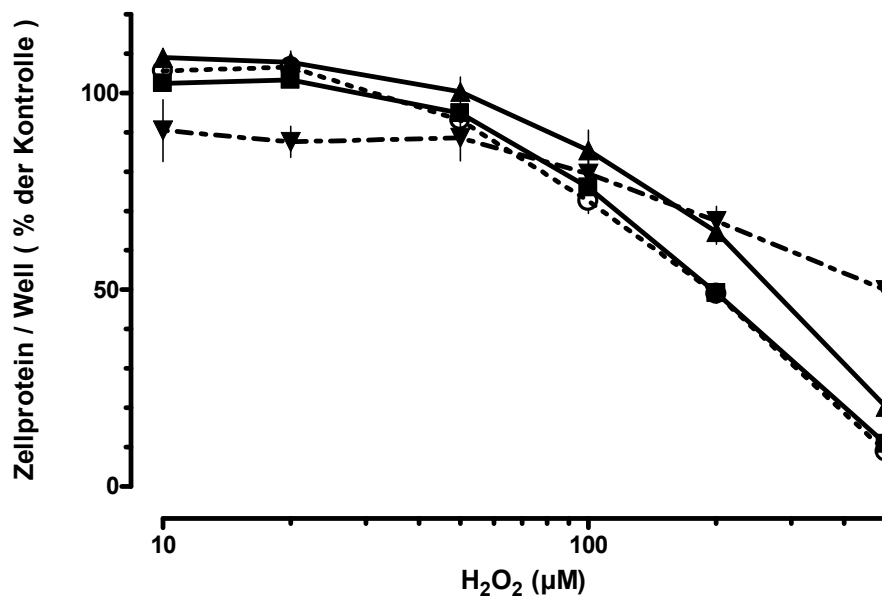


Abb. 9 Einfluss von Galangin auf die zytotoxische Potenz von CHP (A) und H_2O_2 (B)
 Das Versuchsmedium enthielt (■) kein Galangin, (○) 2 μM Galangin, (▲) 5 μM Galangin und (▼) 10 μM Galangin. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der Wells (kein Galangin, CHP bzw. H_2O_2 im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

Galangin ihr Maximum mit einem durchschnittlichen Anteil von 44 % vitaler Zellen gemessen als Zellprotein. Höhere Galanginkonzentrationen führten zu keiner weiteren Steigerung des zytoprotektiven Effektes, sondern zu einem erneuten Verlust an vitalen Zellen, bedingt durch die eigene zytotoxische Wirkung des Flavonoids.

Auf der Grundlage der Ergebnisse des Versuchsprotokolls 1 wurden die Galangin-Konzentrationen 2, 5 und 10 μM zur näheren Betrachtung ihrer zytoprotektiven Potenz ausgewählt. Die Ergebnisse der entsprechend dem Versuchsprotokoll 2 durchgeführten Experimente zeigen die *Abbildungen 9 A* und *B*. Galangin führte zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von CHP zu höheren Konzentrationen. Während der EC_{50} -Wert für CHP im Mittel bei den Kontrollen bei 46 μM lag, wurde er durch Zugabe von 2 μM Galangin um einen Faktor von 1,3, bei 5 μM um 2,6 und bei 10 μM um 6,0 nach rechts verlagert (*Abb. 9 A*).

Die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 wurde ebenfalls durch Galangin konzentrationsabhängig vermindert, aber in geringerem Maße als bei CHP. So wurde der EC_{50} -Wert für H_2O_2 , der bei den Kontrollen durchschnittlich 192,5 μM betrug, bei gleichzeitiger Anwesenheit von 5 μM Galangin um das 1,4fache und bei 10 μM Galangin auf über das Doppelte erhöht (*Abb. 9 B*).

3.2.3 Wirkung von Taxifolin

Entsprechend dem Versuchsprotokoll 1 wurden zwei Experimente mit Taxifolin im Konzentrationsbereich von 2 bis 100 μM durchgeführt. Wie in *Abbildung 10* graphisch dargestellt, war bis zu einer Konzentration von 20 μM Taxifolin kein signifikanter Verlust an Zellprotein pro Well messbar. Erst in höheren Konzentrationen konnte das Flavonoid den Anteil vitaler Zellen mindern. Konzentrationen von 100 μM Taxifolin wirkten signifikant zytotoxisch ($p < 0.05$, $n=4$). Taxifolin konnte bei gleichzeitiger Exposition der Zellen mit Peroxiden lediglich gegenüber CHP zytoprotektiv wirken, wobei auch hier Konzentrationen bis 20 μM des Flavonoids keinen schützenden Effekt aufwiesen. In höheren Konzentrationsbereichen war ein Anstieg an Zellprotein zu verzeichnen. So überlebten beim Hinzufügen von 100 μM Taxifolin ca. 45 % der Zellen die Behandlung mit CHP. In den Experimenten mit H_2O_2 hingegen war selbst bei gleichzeitigem Vorhandensein der höchsten Konzentration des Flavonoids kein Nachweis vitaler Zellen möglich.

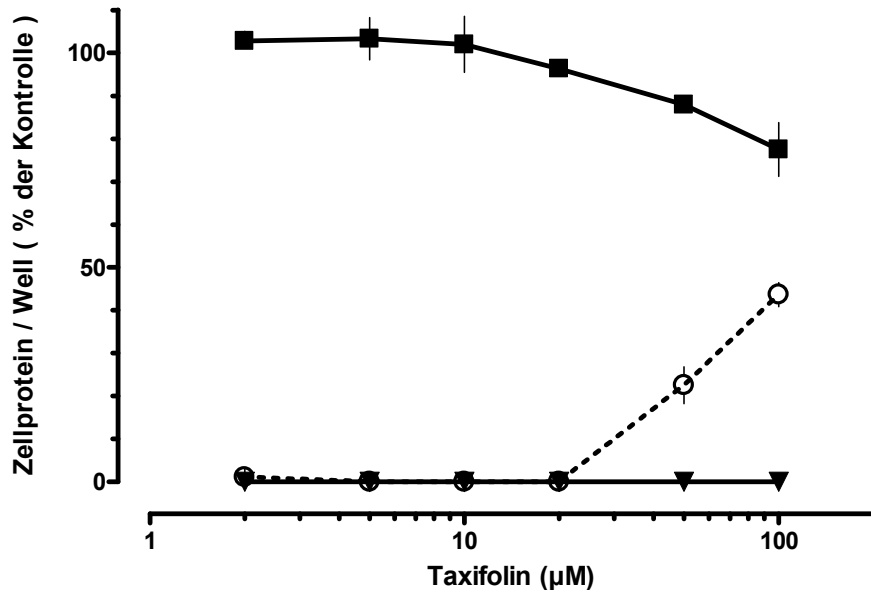


Abb. 10 Zytotoxische Wirkung von Taxifolin und Zytoprotektion gegenüber Peroxiden
Das Versuchsmedium enthielt (■) Taxifolin, (○) Taxifolin und 100 µM CHP sowie (▼) Taxifolin und 500 µM H₂O₂. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein Taxifolin, kein Peroxid im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

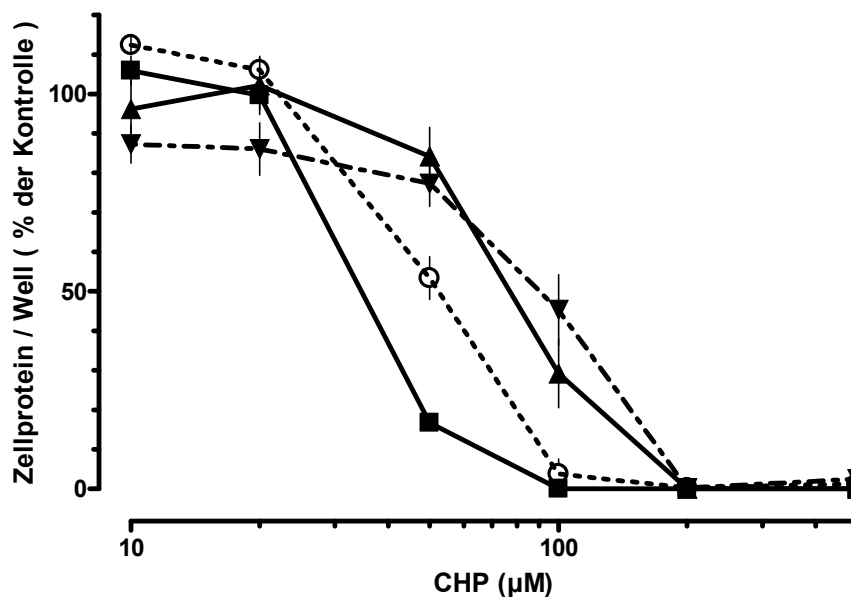


Abb. 11 Einfluss von Taxifolin auf die zytotoxische Potenz von CHP
Das Versuchsmedium enthielt (■) kein Taxifolin, (○) 20 µM Taxifolin, (▲) 50 µM Taxifolin und (▼) 100 µM Taxifolin. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der Wells (kein Taxifolin, kein CHP im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

Folglich wurde in den Experimenten nach dem Versuchsprotokoll 2 nur der Einfluss von Taxifolin auf die zytotoxische Potenz von CHP untersucht. Hierbei wurden die

Konzentrationen 20, 50 und 100 μM des Polyphenols der genaueren Betrachtung unterzogen. Es stellte sich heraus, dass Taxifolin konzentrationsabhängig die Empfindlichkeit der C6-Zellen gegenüber CHP vermindern konnte. So zeigt *Abbildung 11* die Verlagerung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für CHP nach rechts um den Faktor 1,5 bei Hinzugabe von 20 μM Taxifolin, um 2,2 bei Gabe von 50 μM und um 2,6 bei 100 μM , wobei der EC_{50} -Wert für CHP in den Kontrollen im Mittel 34,5 μM betrug.

3.2.4 Wirkung von Resveratrol

Auf Grund der geringeren Löslichkeit von Resveratrol wurde, anders als bei den Versuchen mit den anderen Polyphenolen, 50 μM als höchste Konzentration ausgewählt.

Die Exposition gegenüber 20 μM Resveratrol führte bereits zu einem Verlust von Zellprotein pro Well. Bei Anwesenheit von 50 μM Resveratrol betrug der Anteil vitaler Zellen durchschnittlich nur noch 57 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (*Abb. 12*).

Die C6-Zellen haben die alleinige Behandlung mit den Peroxiden CHP und H_2O_2 nicht überlebt (*Abb. 12*). Während jedoch durch Hinzugabe von Resveratrol der zytotoxische Effekt von H_2O_2 nicht aufgehoben wurde, bot das Polyphenol einen Schutz gegenüber der Wirkung von CHP. Dabei entfaltete sich der größte zytoprotektive Effekt bei einer Konzentration von 20 μM Resveratrol. Es wurde ein Anstieg des Zellproteins pro Well auf im Mittel 31,5 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

Da Resveratrol in den Experimenten des Versuchsprotokolls 1 nicht zytoprotektiv gegenüber H_2O_2 wirkte, wurde auf die Durchführung von Versuchen mit diesem Peroxid im zweiten Protokoll verzichtet. Es wurde nur die zytoprotektive Potenz von Resveratrol gegenüber CHP genauer charakterisiert, wobei folgende Konzentrationen basierend auf den Ergebnissen des Versuchsprotokolls 1 ausgewählt wurden: 5, 10 und 20 μM (*Abb. 13*).

Während der EC_{50} -Wert für CHP in den Kontrollen durchschnittlich 52,5 μM betrug, lag er in Anwesenheit von 5 μM Resveratrol bei ca. 76 μM . Somit wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve um den Faktor 1,4 nach rechts verschoben. Durch

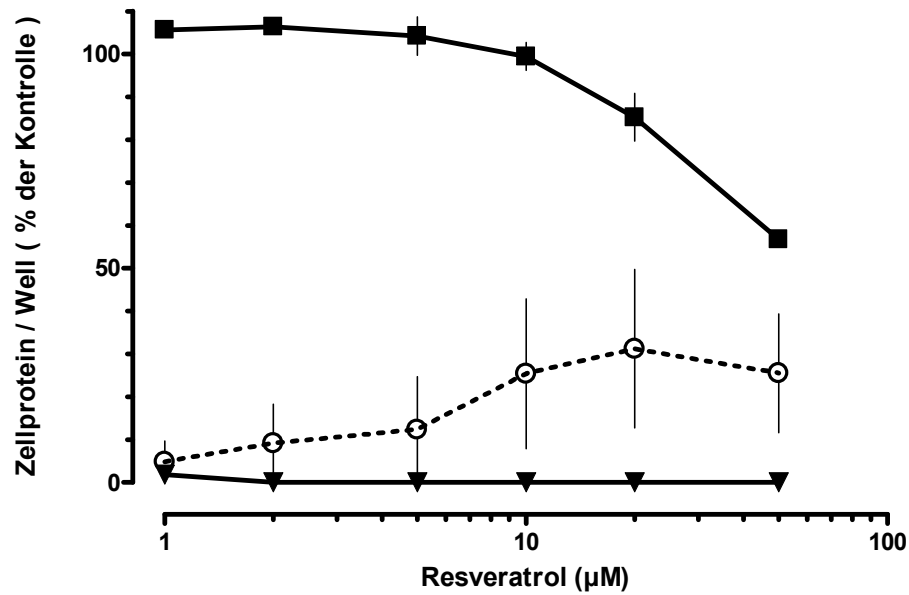


Abb. 12 Zytotoxische Wirkung von Resveratrol und Zytoprotektion gegenüber Peroxiden
Das Versuchsmedium enthielt (■) Resveratrol, (○) Resveratrol und 100 µM CHP sowie (▼) Resveratrol und 500 µM H₂O₂. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein Resveratrol, kein Peroxid im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

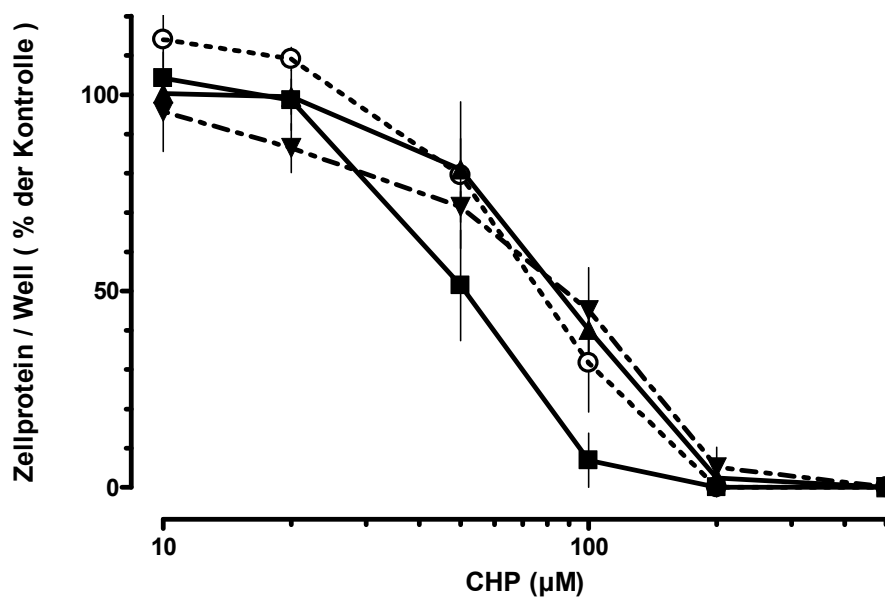


Abb. 13 Einfluss von Resveratrol auf die zytotoxische Potenz von CHP
Das Versuchsmedium enthielt (■) kein Resveratrol, (○) 5 µM Resveratrol, (▲) 10 µM Resveratrol und (▼) 20 µM Resveratrol. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der Wells (kein Resveratrol, kein CHP im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

Hinzugabe von 10 bzw. 20 µM des Polyphenols konnte der zytoprotektive Effekt nur noch in geringem Maße gesteigert werden. Bei gleichzeitiger Inkubation mit 10 µM

Resveratrol wurde der EC_{50} -Wert für CHP um den Faktor 1,7 auf im Mittel 87 μM angehoben und bei 20 μM um den Faktor 1,8 auf einen durchschnittlichen Wert von 93,5 μM .

3.2.5 Wirkung von Genistein

Genistein wurde im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 100 μM untersucht. Wie in *Abbildung 14* dargestellt, war bereits eine Konzentration von 10 μM deutlich zytotoxisch. Der EC_{50} -Wert für das Flavonoid betrug im Mittel 17,5 μM .

Die Empfindlichkeit der C6-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von CHP sowie auch H_2O_2 , die zu einem vollständigen Verlust an Zellprotein führte, konnte bei gleichzeitiger Exposition mit Genistein nicht vermindert werden (*Abb.14*). Dieses Flavonoid wirkte somit nicht zytoprotektiv. Daher wurde auf die Durchführung des zweiten Versuchsprotokolls verzichtet.

3.2.6 Wirkung von (+)-Catechin

Zunächst wurde ein Versuch mit 100 μM (+)-Catechin als höchste Konzentration durchgeführt. Da das Polyphenol bis zu dieser Konzentration weder zytoprotektiv noch zytotoxisch wirkte, wurde die Wirkung im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 1000 μM untersucht. Ein deutlicher Verlust an Zellprotein und somit eine zytotoxische Wirkung von (+)-Catechin konnte bei einer Konzentration von 500 μM beobachtet werden. Der EC_{50} -Wert für das Flavonoid lag im Mittel bei 853 μM .

Die Anwesenheit von 100 μM CHP bzw. 500 μM H_2O_2 führte zu einem vollständigen Verlust der Zellen. Wie in *Abbildung 15* deutlich wird, bot (+)-Catechin in den untersuchten Konzentrationen keinen Schutz gegenüber der zytotoxischen Wirkung beider Peroxide. Es war kein Anstieg an Zellprotein messbar.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde, wie auch bei Genistein, auf die Durchführung des Versuchsprotokolls 2 zur genauen Charakterisierung der zytoprotektiven Potenz des Polyphenols verzichtet.

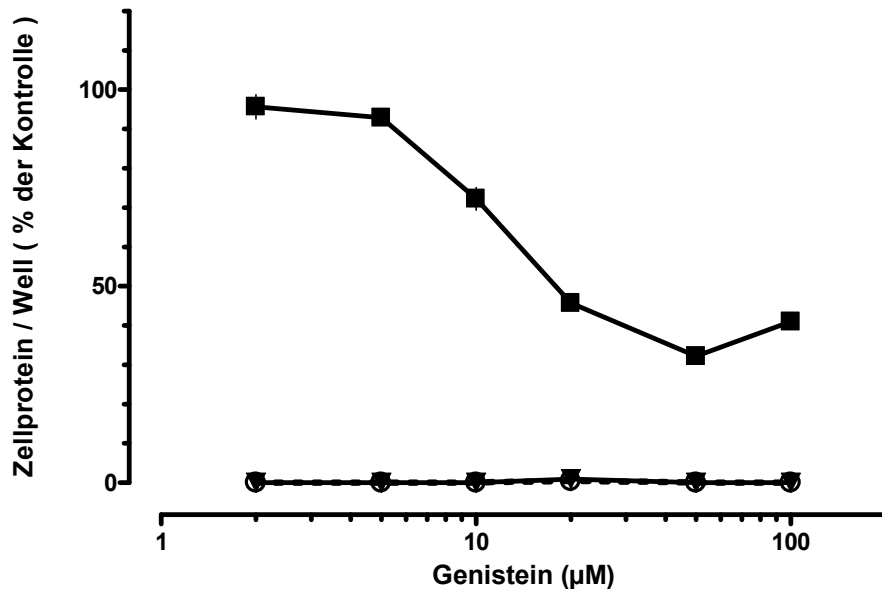


Abb. 14 Zytotoxische Wirkung von Genistein und Zytoprotektion gegenüber Peroxiden
Das Versuchsmedium enthielt (■) Genistein, (○) Genistein und 100 µM CHP sowie (▼) Genistein und 500 µM H₂O₂. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein Genistein, kein Peroxid im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

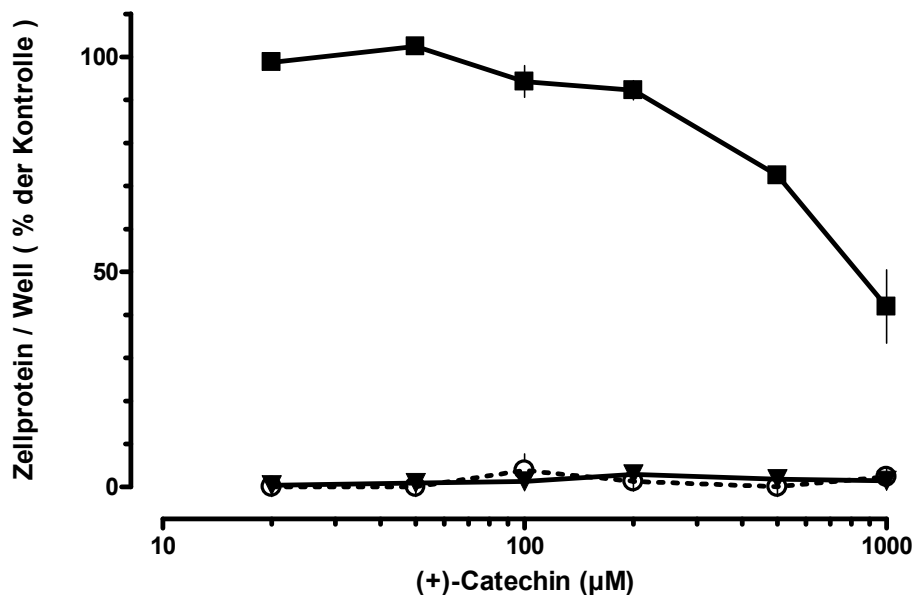


Abb. 15 Zytotoxische Wirkung von (+)-Catechin und Zytoprotektion gegenüber Peroxiden
Das Versuchsmedium enthielt (■) (+)-Catechin, (○) (+)-Catechin und 100 µM CHP sowie (▼) (+)-Catechin und 500 µM H₂O₂. Die Kontrolle entspricht dem Proteingehalt der unbehandelten Wells (kein (+)-Catechin, kein Peroxid im Medium). Dargestellt sind die Mittelwerte + range (n=2).

3.2.7 Wirkung der Polyphenole im Vergleich

Tabelle 2 Zytotoxische und zytoprotektive Wirkung der Polyphenole

	Zytotoxische Aktivität	Zytoprotektive Aktivität			
		CHP		H ₂ O ₂	
Polyphenol	EC ₂₀ (µM) ¹	EC ₅₀ +Polyphenol/ EC ₅₀ -Polyphenol ²	Protektive Konzentration des Polyphenols(µM) ³	EC ₅₀ +Polyphenol/ EC ₅₀ -Polyphenol ²	Protektive Konzentration des Polyphenols(µM) ³
Quercetin	12	6,3	20	>4,7	20
Galangin	13	6,0	10	>2,3	10
Taxifolin	86	2,6	100	Kein Schutz	-
Resveratrol	24	1,8	20	Kein Schutz	-
(+)-Catechin	358	Kein Schutz	-	Kein Schutz	-
Genistein	8	Kein Schutz	-	Kein Schutz	-

¹ Konzentration in µM, bei der eine Reduktion des Proteingehaltes um 20 % im Vergleich zur Kontrolle stattfand (Versuchsprotokoll 1)

² Quotient aus dem EC₅₀-Wert bei gleichzeitiger Inkubation mit der höchsten untersuchten Konzentration des Polyphenols (s. Protektive Konzentration des Polyphenols) und ohne Polyphenol (Versuchsprotokoll 2)

³ höchste untersuchte Konzentration des Polyphenols im Versuchsprotokoll 2

Um die zytotoxische Wirkung der sechs untersuchten Polyphenole zu quantifizieren, wurden die EC₂₀-Werte, die der Konzentration entsprechen, die zu einer Reduktion des Proteingehaltes pro Well um 20 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte, bestimmt.

Unter den sechs Polyphenolen stellte sich Genistein als die Substanz mit der höchsten zytotoxischen Potenz heraus mit einem EC₂₀-Wert von 8 µM. Das Polyphenol mit der zweithöchsten zytotoxischen Potenz war Quercetin, gefolgt von Galangin, Resveratrol und Taxifolin. (+)-Catechin hatte den geringsten zytotoxischen Effekt mit einem EC₂₀-Wert von 358 µM (Tab. 2).

Um die zytoprotektive Aktivität der Polyphenole zu charakterisieren, wurden die Quotienten aus den EC₅₀-Werten der Peroxide in An- bzw. Abwesenheit der höchsten eingesetzten Konzentration der Phenole berechnet (Tab. 2). Im Vergleich

zu den anderen Substanzen boten Quercetin und Galangin den größten Schutz gegenüber der zytotoxischen Wirkung von CHP. Zusätzlich wirkten sie auch protektiv gegenüber H_2O_2 . Taxifolin und Resveratrol hingegen entfalteten nur Schutz vor CHP. (+)-Catechin und Genistein zeigten gar keinen zytoprotektiven Effekt.

Bei allen Polyphenolen lagen die protektiven Konzentrationen in einem bereits toxischen Bereich oder in seiner Nähe.

3.3 Einfluss von Polyphenolen auf die durch CHP induzierte Lipidperoxidation

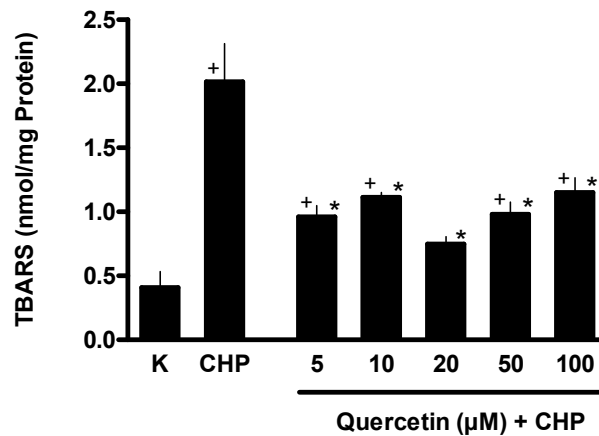
Aus den Versuchen zur Zytotoxizität und Zytoprotektivität der Polyphenole wurden die drei Flavonoide mit der größten zytoprotektiven Potenz, also Quercetin, Galangin und Taxifolin, zur Untersuchung ihres Einflusses auf die durch CHP induzierte Lipidperoxidation ausgewählt.

Um im Thiobarbiturat-Test eine ausreichende Farbreaktion zu erzielen, wurde eine höhere Zellzahl benötigt. Daher fand die Aussaat in 24-Well-Gewebeplatten mit 200.000 Zellen pro Well statt. Die größere Menge an Zellprotein pro Well nimmt Einfluss auf die Zytotoxizität von CHP. So verschoben sich die EC_{50} -Werte für die zytotoxische Wirkung von CHP in 24-Well-Platten im Vergleich zu 96-Well-Platten zu höheren Konzentrationen. Deshalb wurde für die Versuche zur Lipidperoxidation eine höhere Konzentration von CHP ausgewählt als in den Versuchen nach Protokoll 1. Des Weiteren wurde parallel ein MTT-Test in 24-Well-Platten durchgeführt, um die Zytotoxizität bzw. –protektivität der Polyphenole bei höheren Zellproteinkonzentrationen zu untersuchen, und um somit vergleichbare Aussagen treffen zu können.

Durch Hinzugabe von 500 μM CHP wurde in den C6-Gliomzellen Lipidperoxidation ausgelöst. Die TBARS-Produktion stieg gegenüber den unbehandelten Kontrollen von $0,67 \pm 0,49$ auf $2,40 \pm 0,93$ nmol/mg Protein ($n=11$) an.

Die durch CHP induzierte Lipidperoxidation wurde durch die untersuchten Polyphenole Quercetin, Galangin und Taxifolin vermindert, wobei eine signifikante Abnahme der TBARS-Produktion bei Quercetin im gesamten Konzentrationsbereich nachweisbar war und bei Taxifolin erst ab einer Konzentration von 20 μM . Eine Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Lipidperoxidation war jedoch weder

A



B

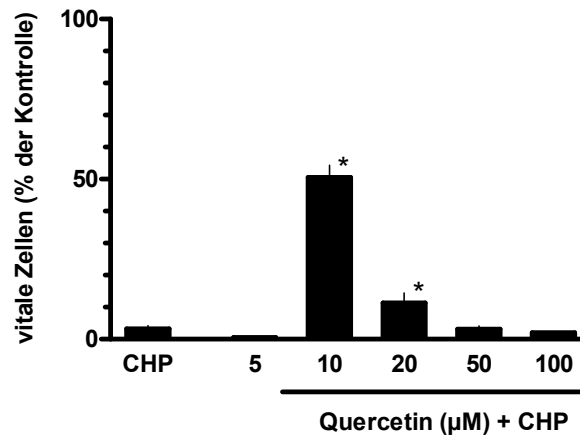


Abb. 16 Hemmung der lipidperoxidierenden und zytotoxischen Wirkung von CHP (500 µM) durch Quercetin

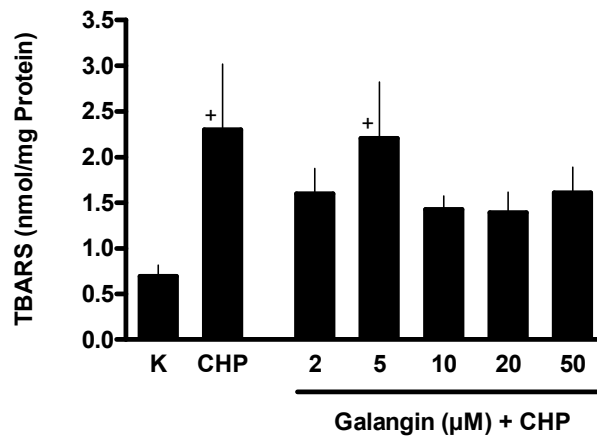
A. TBARS-Produktion in nmol/mg Protein. Die Kontrolle (K) enthielt weder CHP noch Quercetin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). ⁺ Signifikanter Unterschied zur Kontrolle, * signifikanter Unterschied zur Exposition gegenüber CHP ohne gleichzeitige Inkubation mit Quercetin, $p < 0.05$.

B. MTT-Test. Die Kontrolle entspricht dem Anteil der vitalen Zellen der unbehandelten Wells (kein CHP, kein Quercetin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). * Signifikanter Unterschied zur Exposition gegenüber CHP ohne gleichzeitige Inkubation mit Quercetin, $p < 0.05$.

bei Quercetin noch bei den anderen beiden Polyphenolen erkennbar (Abb.16 A, 17 A, 18 A).

Im MTT-Test wirkte CHP (500 µM) deutlich zytotoxisch. Der Anteil der vitalen Zellen fiel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf $4,4 \pm 4,3$ % (n=11) ab.

A



B

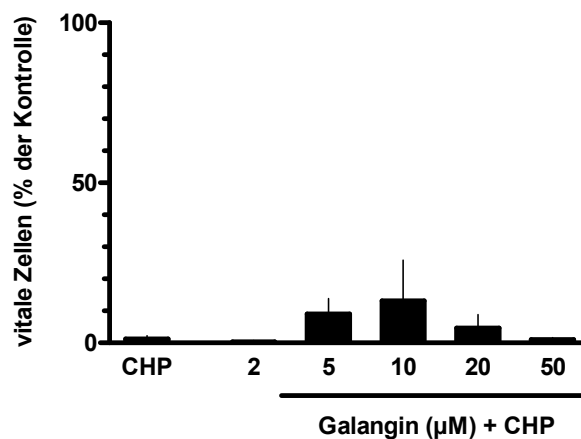


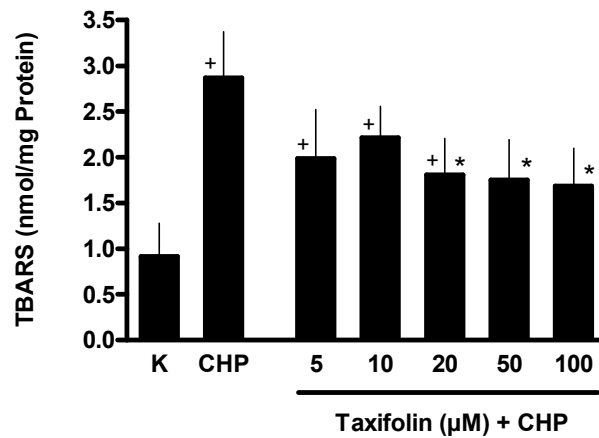
Abb. 17 Hemmung der lipidperoxidierenden und zytotoxischen Wirkung von CHP (500μM) durch Galangin

A. TBARS-Produktion in nmol/mg Protein. Die Kontrolle (K) enthielt weder CHP noch Galangin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3). ⁺ Signifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0.05$.

B. MTT-Test. Die Kontrolle entspricht dem Anteil der vitalen Zellen der unbehandelten Wells (kein CHP, kein Galangin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3).

Eine signifikante protektive Wirkung gegenüber CHP wurde lediglich durch 10 und 20 μM Quercetin entfaltet. Bei diesen Konzentrationen überlebten im Mittel 51 % bzw. 11 % der C6-Zellen die Behandlung mit CHP (*Abb.16 B*). Die anderen Konzentrationen von Quercetin sowie die Polyphenole Galangin und Taxifolin boten nur einen geringen oder gar keinen Schutz vor der Zytotoxizität des CHP (*Abb.16 B, 17 B, 18 B*).

A



B

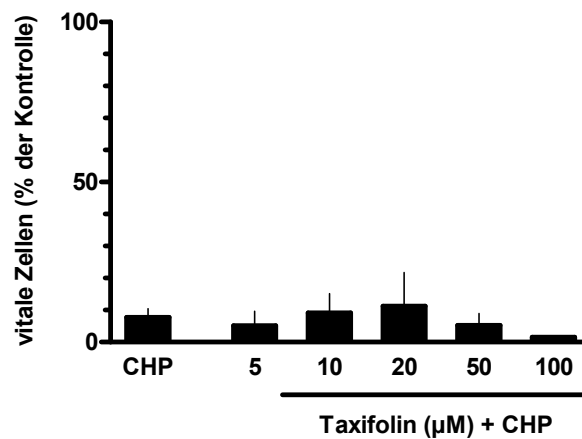


Abb. 18 Hemmung der lipidperoxidierenden und zytotoxischen Wirkung von CHP (500μM) durch Taxifolin

A. TBARS-Produktion in nmol/mg Protein. Die Kontrolle (K) enthielt weder CHP noch Taxifolin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). + Signifikanter Unterschied zur Kontrolle, * signifikanter Unterschied zur Exposition gegenüber CHP ohne gleichzeitige Inkubation mit Taxifolin, $p < 0.05$.

B. MTT-Test. Die Kontrolle entspricht dem Anteil der vitalen Zellen der unbehandelten Wells (kein CHP, kein Taxifolin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte pflanzliche Polyphenole einerseits auf ihre Fähigkeit C6-Zellen vor oxidativem Stress zu schützen und andererseits auf ihre zytotoxische Aktivität zu untersuchen.

Oxidativer Stress wurde durch Wasserstoffperoxid und Cumolhydroperoxid induziert. Beide Peroxide führten konzentrationsabhängig zum Verlust von C6 Zellen (*Abb. 5*). CHP und H_2O_2 werden in der durch Eisenionen katalysierten Fentonreaktion zu reaktiven Hydroxyl- bzw. Alkoxyradikalen aktiviert (Starke und Farber, 1985). Da die toxische Wirkung beider Peroxide durch den Eisenchelator Deferoxamin und den Radikalfänger Dimethylthioharnstoff wirksam unterbunden wird (Zielińska et al., 2003), ist die Zytotoxizität beider Substanzen tatsächlich auf die Generierung reaktiver Spezies zurückzuführen. Auf Grund seiner Lipophilie scheint CHP im Gegensatz zu H_2O_2 seine Wirkung besonders an der Zellmembran zu entfalten (Vroegop et al., 1995). So löste CHP in C6 Zellen auch Lipidperoxidation aus (*Abb. 16 A-18 A*). H_2O_2 vermag hingegen keine Lipidperoxidation in C6 Zellen zu induzieren (Linden et al., 2008). Die Frage, ob die durch CHP ausgelöste Lipidperoxidation Ursache, Folge oder nur ein Begleitphänomen des Zelltodes ist, diskutierten Linden et al. (2008). In Versuchen zur Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit zeigten sie, dass die durch CHP induzierte Lipidperoxidation vor dem Zelltod eintrat, so dass die Annahme, Lipidperoxidation sei die Folge des Zelltods, ausgeschlossen werden kann.

CHP erwies sich als das potentere Peroxid. So betrug der EC_{50} -Wert für CHP $37,6 \pm 12,5 \mu\text{M}$, während eine Reduktion des Proteingehalts von 50 % erst bei $146,8 \pm 54,9 \mu\text{M}$ H_2O_2 beobachtet wurde. Die größere Empfindlichkeit von C6 Zellen gegenüber der toxischen Wirkung von CHP ist möglicherweise durch Unterschiede in der Elimination beider Peroxide erklärbar. Die Entgiftung von H_2O_2 kann sowohl durch die in den Peroxisomen lokalisierte Katalase als auch die zytosolische Glutathionperoxidase erfolgen (Farber, 1994), wobei der Abbau bei Vorhandensein höherer H_2O_2 Konzentrationen hauptsächlich durch die Katalase erfolgt (Makino et al., 2008). CHP wird hingegen als organisches Peroxid allein über die Glutathionperoxidase enzymatisch abgebaut. C6 Zellen verfügen über eine hohe Aktivität der Katalase jedoch über eine niedrige Aktivität der Glutathionperoxidase (Makino et al., 2008), so dass H_2O_2 möglicherweise schneller eliminiert werden kann.

Die untersuchten Polyphenole schützten in unterschiedlichem Ausmaß C6 Gliomzellen vor der durch Peroxide induzierten oxidativen Schädigung. Quercetin und Galangin erwiesen sich als die wirksamsten Substanzen, die sowohl vor CHP als auch vor H_2O_2 Schutz boten, während Taxifolin und Resveratrol nur den Schaden durch CHP reduzieren konnten. Genistein und Catechin entfalteten gar keine protektive Wirkung. Quercetin und Taxifolin konnten zudem signifikant Lipidperoxidation unterbinden. Abhängig von der Konzentration führten alle Polyphenole zum Zellverlust, wobei Genistein sich als das Flavonoid mit der höchsten zytotoxischen Potenz herausstellte.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten andere Studien, wobei besonders Quercetin zahlreiche Zelltypen vor oxidativem Stress unterschiedlicher Genese schützen konnte (Alía et al., 2006; Crespo et al., 2008; Hanneken et al., 2006; Sasaki et al., 2003; Zielińska et al., 2003). Aber auch Resveratrol (Sun et al., 2002), Galangin (Hanneken et al., 2006; Ishige et al., 2001) und Taxifolin (Hanneken et al., 2006; Sasaki et al., 2003) erwiesen sich in unterschiedlichem Ausmaß als wirksam. Beispielsweise zeigten Hanneken et al. (2006), dass Quercetin und Galangin bis zu einer Konzentration von 50 μM humane Retinaepithelzellen vor der durch 120 μM *Tert*-butyl-hydroperoxid sowie 250 μM H_2O_2 induzierten oxidativen Schädigung schützen konnten, nachdem die Zellen eine Stunde mit den Flavonoiden vorinkubiert worden sind. Taxifolin erwies sich in dieser Studie als schwach wirksam. Catechin und Genistein entfalteten keine protektive Wirkung. Eine fehlende Wirksamkeit dieser beiden Flavonoide ist auch in weiteren Studien beschrieben worden (Di Virgilio et al., 2004; Ishige et al., 2001). In neuronalen Zellen bot Catechin jedoch konzentrationsabhängig (10-300 μM) Schutz vor oxidativem Stress, der unter anderem durch H_2O_2 induziert wurde (Mercer et al., 2005). Zytoprotektion durch Genistein ist ebenfalls beobachtet worden (Klein und King, 2007).

Da die intrazelluläre Bildung von reaktiven Spezies nach der Induktion von oxidativem Stress in unterschiedlichen Zelltypen durch Polyphenole gehemmt werden kann (Alía et al., 2006; Crespo et al., 2008; Hanneken et al., 2006; Rüdeler et al., 2008), beruht die Zytoprotektion tatsächlich auf antioxidativen Eigenschaften. Rüdeler et al. (2008) beobachteten die Reduktion reaktiver Spezies in C6 Zellen bei Konzentrationen, die im Bereich der protektiven Konzentrationen dieser Studie lagen, nachdem oxidativer Stress durch 500 μM CHP ausgelöst worden ist. Als besonders effektiv erwies sich Galangin, welches bereits bei 2 μM signifikant die intrazelluläre

Akkumulation von Radikalen senkte. Gleichzeitig demonstrierten R weler et al. (2008) die prooxidative Aktivität von Genistein. Während dieses Flavonoid in Anwesenheit von CHP den Spiegel von Radikalen in C6 Zellen reduzierte, stieg der Spiegel in Abwesenheit des Peroxids signifikant in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 20 μM Genistein an. Diese prooxidative Aktivität steht möglicherweise im Zusammenhang mit der beobachteten Genotoxizität von Genistein (Klein und King, 2007) und der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Zytotoxizität.

Konzentrationsabhängige toxische Wirkungen der anderen fünf Polyphenole sind ebenfalls in der Literatur beschrieben, was im Einklang mit den hier erhobenen Ergebnissen steht. So löste Resveratrol bei einer Konzentration von 100 μM DNA-Strangbrüche in C6 und Rattenhepatom-Zellen aus und führte zu Nekrose bzw. Apoptose (Michels et al., 2006). Quercetin und Taxifolin verursachten Zelltod ab einer Konzentration von 50 μM (Al a et al., 2006; Crespo et al., 2008; Robaszkiewicz et al., 2007).

Zusätzlich zur zytoprotektiven und zytotoxischen Wirkung der Polyphenole wurde der Einfluss von Quercetin, Galangin und Taxifolin auf die Lipidperoxidation untersucht. Diese drei Flavonoide wurden ausgesucht, da sie sich als wirksam gegenüber CHP erwiesen, welches Lipidperoxidation auslösen kann. Quercetin und Taxifolin konnten die TBARS-Produktion signifikant herabsetzen, aber auch Galangin hemmte im Vergleich mit CHP die Lipidperoxidation. Al a et al. (2006) wiesen Schutz vor der durch *Tert*-butyl-hydroperoxid induzierten Lipidperoxidation in humanen Hepatomzellen durch Quercetin (0,1-10 μM) nach. Hingegen finden sich in der Literatur keine Angaben zur Protektion vor Lipidperoxidation durch Taxifolin und Galangin in Zellkulturen. Die lipidperoxidationshemmende Wirkung von Polyphenolen wurde aber an Mikrosomen untersucht (Cos et al., 2001), wobei sich auch Catechin und Genistein als wirksam erwiesen haben.

Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse von in vitro Studien, die Unterschiede in der Wirksamkeit innerhalb der Gruppe der Polyphenole und die anti- als auch prooxidativen Effekte spiegeln die Komplexität der Wirkung wieder, die in verschiedenen Wirkmechanismen und in der strukturellen Vielfalt begründet ist.

Polyphenole können durch diverse Mechanismen vor oxidativem Stress sch tzen. So sind sie in der Lage, freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies direkt abzufangen, oder können deren Bildung verhindern, indem sie Übergangsmetalle chelatieren (Cotelle, 2001; Rice-Evans et al., 1997). Sie können aber auch die

zelleigenen antioxidativen enzymatischen und nicht-enzymatischen Systeme beeinflussen, indem sie zum Beispiel die Expression antioxidativer Enzyme aktivieren (Cotelle, 2001).

In zellfreien Testsystemen haben sich alle in der vorliegenden Studie untersuchten Polyphenole als gute Radikalfänger erwiesen (Rice-Evans et al., 1997). Die antioxidative Potenz einer Substanz kann mit Hilfe des TEAC-Wertes (Trolox equivalent antioxidant capacity) angegeben werden. Hierbei wird die Fähigkeit eines Antioxidans gemessen, das Radikalkation der 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazidin-6-sulfonsäure) (ABTS) im wässrigen Milieu neutralisieren zu können, wobei das Vitamin E-Derivat Trolox als Referenz dient. Betrachtet man die in *Tabelle 3* dargestellten TEAC-Werte so fällt auf, dass in der Reihe der untersuchten Substanzen Catechin nach Quercetin über die höchste antioxidative Potenz verfügt, während Galangin noch hinter Genistein das Schlusslicht bildet. Somit lässt sich aus den Ergebnissen des TEAC-Assays keine Vorhersage über die zytoprotektive Aktivität von Polyphenolen in lebenden Zellen treffen. In *Tabelle 3* sind zusätzlich die Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der sechs Polyphenole aufgelistet. Es ist weder ein Zusammenhang zwischen den TEAC-Werten noch ein Zusammenhang zwischen der in der vorliegenden Arbeit ermittelten zytoprotektiven Aktivität und der Lipophilie der Antioxidantien ersichtlich.

Tabelle 3

Zytoprotektive Aktivität, antioxidative Potenz (TEAC Assay) und Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP) der untersuchten Polyphenole

Polyphenol	Zytoprotektive Aktivität (CHP) ¹	TEAC (mM) ²	log P ³
Quercetin	6,3	4,84 ± 0,45	2,26
Galangin	6,0	2,08 ± 0,11	2,86
Taxifolin	2,6	3,09 ± 0,58	0,25
Resveratrol	1,8	2,88 ± 0,15	1,87
(+)-Catechin	Kein Schutz	3,42 ± 0,43	0,08
Genistein	Kein Schutz	2,96 ± 0,49	2,58

¹ Zytoprotektive Aktivität entnommen aus Tabelle 2

² TEAC-Werte entnommen aus Ishige et al. (2001)

³ log P-Werte entnommen aus Galati et al. (2000)

Jedoch nimmt die Lipophilie Einfluss auf die Zytotoxizität der Polyphenole. Die zytotoxische Aktivität der untersuchten Substanzen korreliert positiv mit ihrem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (Abb. 19). Diesen Zusammenhang beschreiben auch Sergediené et al. (1999) für andere Polyphenole.

Die antioxidative Effektivität von Polyphenolen ist mit bestimmten Strukturmerkmalen assoziiert. Als besonders wirksam haben sich Phenole mit ortho-ständigen Hydroxylgruppen am B-Ring (Catechol-Struktur) und vor allem mit einer Kohlenstoff-Doppelbindung in Kombination mit einer 4-Keto- und 3-Hydroxylgruppe am C-Ring und einer 5-Hydroxylgruppe am A-Ring erwiesen (Cotelle, 2001; Rice-Evans et al., 1997). Dies trifft auf die Gruppe der Flavonole zu, zu denen Quercetin und Galangin gezählt werden, die sich in dieser Arbeit auch als die wirksamsten Polyphenole herausstellten.

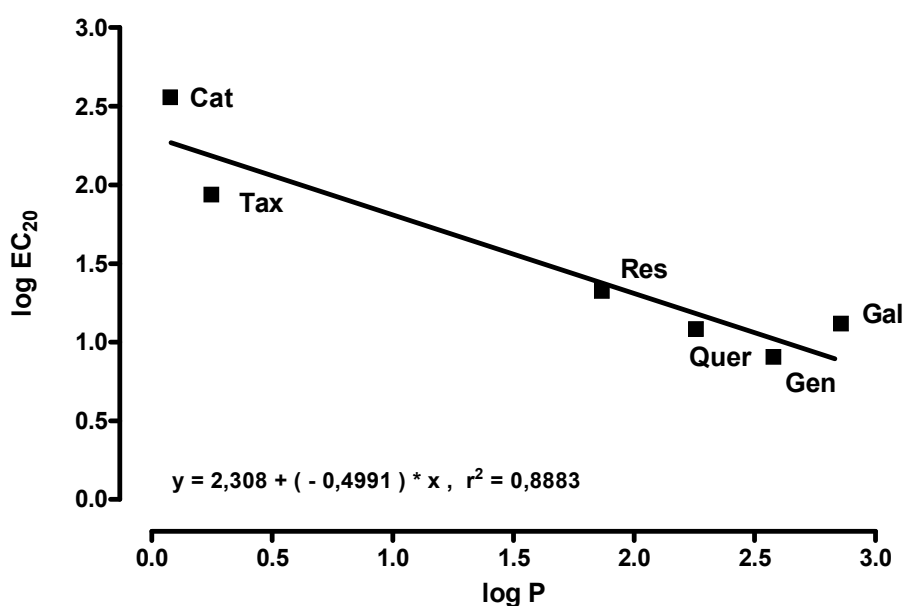


Abb. 19 Zusammenhang zwischen zytotoxischer Aktivität und Lipophilie der Polyphenole
Die EC₂₀-Werte, deren Darstellung in logarithmischer Weise erfolgt, entsprechen der Konzentration, die zu einer Reduktion des Proteingehaltes um 20 % im Vergleich zur Kontrolle führte (n=2). logP gibt den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten wieder.

Das Abfangen von Radikalen geschieht hauptsächlich durch die Abgabe eines Elektrons an das Radikal. Dabei wird das Polyphenol selbst oxidiert, und es entsteht ein Aroxyldradikal (Cotelle, 2001; Metodiewa et al., 1999). Zwei Aroxyldradikale können unter Ausbildung einer chinoiden Struktur miteinander reagieren, die relativ stabil ist.

Das Aroxylradikal kann aber auch mit Sauerstoff reagieren. Hierbei werden ein Chinon und ein Superoxidanion gebildet. Während der antioxidativen Aktivität werden also reaktive Produkte generiert, die innerhalb der Zelle Schaden anrichten können. Boots et al. (2007) demonstrierten, dass während 100 μM Quercetin die DNA von Rattenlungenepithel-Zellen vor der durch H_2O_2 induzierten Schädigung schützten, es gleichzeitig zu einem Verlust von Glutathion und einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration sowie Austritt von LDH als Zeichen von Nekrose kam. Dies führen sie auf die hohe Reaktivität des entstandenen Quercetinchinons gegenüber Thiolgruppen zurück. Das oxidierte Quercetin bindet Glutathion, welches dann nicht mehr zur Verfügung steht, oder reagiert mit anderen Proteinthiolen, so dass Enzyme wie die Kalzium-ATPase in ihrer Funktion gestört werden. Die erhöhte zytoplasmatische Kalziumkonzentration ist selbst toxisch und kann Apoptose auslösen (Boots et al., 2007).

Reaktive Produkte aus Polyphenolen können auch im Rahmen enzymatisch katalysierter Reaktionen und bei autooxidativen Prozessen entstehen (Cotelle, 2001; Metodiewa et al., 1999). Diese Reaktionen laufen besonders bei hohen Konzentrationen von Übergangsmetallen ab. Kritisch anzumerken ist, dass Polyphenole bereits im Kulturmedium oxidieren können (Halliwell, 2008). Dabei scheinen sie besonders instabil in dem in dieser Studie verwendeten Medium DMEM zu sein. Somit könnte die beobachtete Zytotoxizität zum Teil auf die Bildung reaktiver Spezies im Rahmen der Autooxidation der Antioxidantien zurückzuführen sein. Untersuchungen im hiesigen Labor haben allerdings ergeben, dass beispielsweise Quercetin in DMEM tatsächlich zur Entstehung von H_2O_2 führt, dies aber erst bei hohen Konzentrationen (50 bzw. 100 μM) und in relativ geringem Ausmaß (Seibert, pers. Mitteilung).

Neben der Eigenschaft Radikale direkt abzufangen, sind zahlreiche Flavonoide zudem in der Lage, Übergangsmetalle zu chelatieren (Cotelle, 2001; Rice-Evans et al., 1997). Dies trifft jedoch nicht auf Genistein zu (Kruk et al., 2005). Da Übergangsmetalle in der Aktivierung von CHP und H_2O_2 zu Radikalen involviert sind (Starke und Farber, 1985), kann die fehlende Wirksamkeit von Genistein in der vorliegenden Studie zum Teil durch die Unfähigkeit zur Metallchelatierung erklärt werden.

Polyphenole können ihre antioxidative Wirkung zudem entfalten, indem sie Einfluss auf die Expression antioxidativer Enzyme nehmen. Eine erhöhte Aktivität

zytoprotektiver Mechanismen kann dann zur größeren Resistenz gegenüber oxidativem Stress führen. Bis die Anwesenheit eines Induktors jedoch zur Änderung der Enzymaktivität führt, können Stunden bis Tage vergehen. Daher müsste das Polyphenol intrazellulär wirken können, bevor das oxidative Ereignis eintritt. Da aber in der vorliegenden Studie keine Vorinkubation stattfand, spielt dieser Wirkmechanismus hier wahrscheinlich keine bzw. eine untergeordnete Rolle. Dies könnte möglicherweise als weitere Erklärung für die fehlende zytoprotektive Wirkung von Genistein dienen, obwohl einige Arbeitsgruppen durchaus eine Reduktion von oxidativem Stress in Zellen durch Genistein nachweisen konnten (Borrás et al., 2006; Klein und King, 2007). Das Polyphenol reduzierte beispielsweise bei einer Konzentration von 0,5 μM den basalen Peroxidspiegel in Tumorzellen aus humanem Brustdrüsengewebe, nachdem diese 48 h mit Genistein vorinkubiert worden sind (Borrás et al., 2006). Die Reduktion ging einher mit einer Zunahme der Aktivität der Mangan-Superoxiddismutase, verursacht durch die Aktivierung der Kinase ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase) und des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor κ B). Guo et al. (2002) beobachteten einen Anstieg von Glutathion in humanen Endothelzellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit 5 nM Genistein, eventuell bedingt durch Aktivierung von Enzymen, die in die Synthese von GSH, wie zum Beispiel die γ -Glutamylcysteinsynthetase, involviert sind. Die antioxidative Wirkung von Genistein basiert somit möglicherweise weniger auf der Fähigkeit Radikale direkt abzufangen, sondern auf der Eigenschaft zelleigene antioxidative Schutzsysteme zu aktivieren, wobei bereits Konzentrationen im nanomolaren Bereich effektiv sind.

Die Stimulation der γ -Glutamylcysteinsynthetase soll auch durch Quercetin erfolgen und die Ursache für den beobachteten Anstieg der intrazellulären GSH-Spiegel in neuronalen Zellen (Ishige et al., 2001) und in humanen Hepatomzellen (Alía et al., 2006) sein. Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu dem durch Boots et al. (2007) beobachteten Abfall des GSH-Spiegels in Rattenlungenepithel-Zellen. Während Ishige et al. (2001) und Alía et al. (2006) Quercetin bis zu einer Konzentration von 10 μM verwendeten, fiel der GSH-Spiegel bei 100 μM . Interessanterweise beobachteten einige Arbeitsgruppen eine verminderte Aktivität der Katalase, der Superoxiddismutase, der Glutathionperoxidase und der Glutathionreductase durch Quercetin trotz Induktion von oxidativem Stress (Alía et al., 2006; Crespo et al., 2008). Auf Grund seiner hohen antioxidativen Aktivität kann Quercetin die durch das oxidative Agens ausgelöste Peroxidbildung hemmen. Da

also die intrazellulären Spiegel reaktiver Spezies reduziert werden, könnte die normalerweise durch oxidativen Stress induzierte Aktivierung von Enzymen unterbleiben.

Im Fall von Resveratrol beobachteten Rubiolo et al. (2008) einen Anstieg der Aktivität der Katalase, der Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase in Rattenhepatozyten, nachdem diese über 24 h mit Resveratrol (25-75 μM) vorinkubiert worden sind. Die Vorbehandlung schützte die Zellen vor der anschließenden Exposition gegenüber 500 μM *Tert*-butyl-hydroperoxid. Die erhöhte Enzymaktivität führten sie dabei auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 zurück. Die antioxidative Aktivität von Resveratrol scheint somit ähnlich Genistein unter anderem von der Kapazität abzuhängen, zelluläre zytoprotektive Mechanismen zu aktivieren.

Die Zytoprotektion durch Polyphenole beruht also auf komplexen Wirkmechanismen. Dabei gehen antioxidative und prooxidative Aktivität häufig Hand in Hand, so dass Übergänge zwischen Protektion und Toxizität fließend sein können. Die als Therapeutikum eingesetzten Polyphenole sollten jedoch idealerweise über eine möglichst große therapeutische Breite verfügen. Um besonders vielversprechende Phenole herauszufiltern, führten Cos et al. (2001) den sogenannten antioxidativen Selektivitätsindex (ASI) ein. Sie bestimmten die maximale nicht-toxische Dosis eines Flavonoids an humanen Hautfibroblasten und dividierten sie durch die Konzentration, die die Lipidperoxidation in Lebermikrosomen um 50 % reduzierte. Die protektiven und toxischen Effekte wurden also an verschiedenen Systemen untersucht. Ob Polyphenole wirken, ob antioxidative oder prooxidative Effekte überwiegen, hängt aber, wie es die zahlreichen in vitro Studien zeigen, von zahlreichen Faktoren ab, wie zum Beispiel den Versuchsbedingungen, den verwendeten Zellkulturen und der Konzentration. Daher erscheint es sinnvoller, Zytoprotektion und Zytotoxizität in einem Zellsystem zu untersuchen, wie dies in der vorliegenden Studie erfolgt ist. Beim Vergleich der Ergebnisse zeigen sich auch Unterschiede. Trotz eines hohen ASI bot Catechin in dieser Studie C6 Zellen keinen Schutz vor oxidativem Stress. Die bei Cos et al. (2001) beobachteten zytotoxischen Konzentrationen waren um ungefähr den 30 bis 100fachen Faktor höher als die protektiven, Genistein ausgenommen, während in dieser Arbeit die protektiven Konzentrationen der Polyphenole bereits nah am zytotoxischen Bereich lagen (*Tab. 2*), so dass ein therapeutischer Nutzen kritisch bewertet werden sollte. Andererseits ist es fraglich,

ob in vivo überhaupt Plasmaspiegel in diesem Konzentrationsbereich erreicht werden können. Nach normalem Verzehr von Lebensmitteln sind Flavonoidkonzentrationen im Plasma von 1 bis 2 μM gemessen worden (Watzl und Rechkemmer, 2001). Im Fall von Genistein sind aber bereits Effekte im nanomolaren Bereich beobachtet worden, nachdem Zellen über einen längeren Zeitraum mit dem Flavonoid vorinkubiert worden sind (Borrás et al., 2006; Guo et al., 2002), so dass ein therapeutischer Einsatz mit Dosierungen im noch nicht toxischen Bereich möglich wäre. Weitere Untersuchungen müssen folgen.

5 Zusammenfassung

Der in epidemiologischen Studien beobachtete Zusammenhang zwischen einem hohen Konsum von obst- und gemüsereicher Ernährung und einer erniedrigten Inzidenz von Krebs, kardiovaskulären und altersassoziierten Erkrankungen hat zur Suche nach möglichen protektiven Pflanzeninhaltsstoffen geführt, in der Hoffnung diese therapeutisch nutzen zu können. Das wissenschaftliche Interesse gilt unter anderem Polyphenolen, die sich durch ihre antioxidativen aber auch durch ihre antiviralen, antiinflammatorischen und antimutagenen Fähigkeiten auszeichnen. Da ein Therapeutikum über eine möglichst große therapeutische Breite verfügen sollte, war es Ziel dieser Arbeit, ausgewählte Polyphenole einerseits hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und andererseits hinsichtlich ihrer Zytoprotektivität gegenüber oxidativem Stress zu untersuchen.

Die Versuche wurden an Kulturen von C6 Rattengliomzellen durchgeführt. Oxidativer Stress wurde mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das auf Grund seiner Hydrophilie an vielen Orten in der Zelle wirkt, sowie Cumolhydroperoxid (CHP), einem lipophilen organischen Peroxid, welches seine Wirkung hauptsächlich an der Zellmembran entfaltet, ausgelöst. Zu den untersuchten Polyphenolen zählten das Hydroxystilben Resveratrol und die Flavonoide Quercetin, Galangin, Taxifolin, (+)-Catechin sowie Genistein.

Die Exposition mit Peroxiden und / oder Antioxidantien betrug 24 Stunden. Die Versuche zur Zytotoxizität und Zytoprotektivität der Polyphenole wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Maß für die Zellschädigung wurde der Verlust von Zellprotein mit der Methode nach Lowry bestimmt. Die Zytotoxizität der Polyphenole wurde in Abwesenheit der Peroxide erfasst. Die zytoprotektive Wirkung der Antioxidantien wurde als Hemmung bzw. Verminderung der durch 500 μM H_2O_2 oder 100 μM CHP ausgelösten Zellschädigung aufgefasst. Zusätzlich wurden Quercetin, Galangin und Taxifolin hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die durch 500 μM CHP induzierte Lipidperoxidation zu hemmen. Die Messung der Lipidperoxidation erfolgte durch die Bestimmung Thiobarbiturat reaktiver Substanzen (TBARS). Parallel zu den Versuchen zur Lipidperoxidation, die in 24-Well-Platten durchgeführt worden sind, wurde zusätzlich noch die Zellvitalität mit Hilfe des MTT Assays ebenfalls in 24-Well-Platten bestimmt, um die Zytotoxizität bzw. –protektivität der drei Flavonoide bei höheren Zellproteinkonzentrationen zu erfassen.

Sowohl CHP als auch H_2O_2 zeigten eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung. CHP erwies sich als das potentere Peroxid möglicherweise auf Grund von Unterschieden in der intrazellulären Elimination beider Substanzen. Bereits eine Konzentration von $37,6 \pm 12,5 \mu\text{M}$ CHP reduzierte den Proteingehalt in den 96-Well-Mikrotiterplatten um 50 %. Der EC_{50} -Wert für H_2O_2 betrug hingegen $146,8 \pm 54,9 \mu\text{M}$. Die durch die Peroxide verursachte Zellschädigung wurde in unterschiedlichem Ausmaß durch die untersuchten Polyphenole beeinflusst. Quercetin und Galangin haben sich als die wirksamsten Flavonoide erwiesen. Bereits Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ schützten die C6 Zellen vor der toxischen Schädigung sowohl durch CHP als auch H_2O_2 . Taxifolin und Resveratrol reduzierten hingegen nur den durch CHP induzierten Zellschaden, während (+)-Catechin und Genistein gar keine protektive Wirkung entfalteten. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass alle Polyphenole konzentrationsabhängig zum Zellverlust führten. Dabei stellte sich Genistein mit einem EC_{20} -Wert von $8 \mu\text{M}$ als das Flavonoid mit der höchsten zytotoxischen Potenz dar, gefolgt von Quercetin, Galangin, Resveratrol und Taxifolin. (+)-Catechin hatte den geringsten zytotoxischen Effekt mit einem EC_{20} -Wert von $358 \mu\text{M}$. Die positive Korrelation der EC_{20} -Werte und der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Polyphenole lässt auf einen Zusammenhang zwischen Lipophilie und zytotoxischer Aktivität schließen.

Die drei Polyphenole Quercetin, Galangin und Taxifolin verminderten die durch $500 \mu\text{M}$ CHP induzierte Lipidperoxidation. Jedoch war eine signifikante Reduktion der TBARS-Produktion nur bei Quercetin (ab $5 \mu\text{M}$) und Taxifolin (ab $20 \mu\text{M}$) nachweisbar. Eine signifikante zytoprotektive Wirkung im parallel durchgeführten MTT-Test konnte nur für Quercetin bei 10 und $20 \mu\text{M}$ belegt werden.

Zwar konnte in dieser Arbeit eine Zytoprotektion vor oxidativem Stress durch bestimmte Polyphenole wie Quercetin und Galangin nachgewiesen werden, jedoch lagen die protektiven Konzentrationen nah am zytotoxischen Bereich, so dass ein therapeutischer Nutzen kritisch hinterfragt werden muss. Andererseits sind in der Literatur protektive Effekte durch Polyphenole beschrieben, die teilweise bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich auftraten, möglicherweise auf Grund von Wirkmechanismen, die in dem in dieser Arbeit verwendeten Testsystem nicht erfasst werden konnten.

6 Literaturverzeichnis

Alfá, M.; Ramos, S.; Mateos, R.; Granado-Serrano, A.B.; Bravo, L.; Goya, L. (2006): Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 110-118

Baur, J.A.; Sinclair, D.A. (2006): Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Rev. Drug Discov.* 5, 493-506

Bestwick, C.S.; Milne, L. (2006): Influence of galangin on HL-60 cell proliferation and survival. *Cancer Lett.* 243, 80-89

Boots, A.W.; Li, H.; Schins, R.P.F.; Duffin, R.; Heemskerk, J.W.M.; Bast, A.; Haenen, G.R.M.M. (2007): The quercetin paradox. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 89-96

Borrás, C.; Gambini, J.; Gómez-Cabrera, M.C.; Sastre, J.; Pallardó, F.V.; Mann, G.E.; Viña, J. (2006): Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFκB. *FASEB J.* 20, E1476-E1481

Cos, P.; Calomme, M.; Sindambiwe, J.B.; De Bruyne, T.; Cimanga, K.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D. (2001): Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Med.* 67, 515-519

Cotelle, N. (2001): Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Topics Med. Chem.* 1, 569-590

Crespo, I.; García-Mediavilla, M.V.; Almar, M.; Gonzáles, P.; Tuñón, M.J., Sánchez-Campos, S.; Gonzáles-Gallego, J. (2008): Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in chang liver cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1555-1569

Di Virgilio, A.L.; Iwami, K.; Wätjen, W.; Kahl, R.; Degen, G.H. (2004): Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol. Lett.* 151, 151-162

Farber, J.L. (1994): Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl.10), 17-24

Galati, G.; Teng, S.; Moridani, M.Y.; Chan, T.S.; O'Brien, P.J. (2000): Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol. Drug Interact.* 17 (1-4), 311-349

Guo, Q.; Rimbach, G.; Moini, H.; Weber, S.; Packer, L. (2002): ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* 179, 171-180

Halliwell, B. (1996): Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33-50

Halliwell, B. (2008): Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 107-112

Hanneken, A.; Lin, F.F.; Johnson, J.; Maher, P. (2006): Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (7), 3164-3177

Ishige, K.; Schubert, D.; Sagara, Y. (2001): Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 30 (4), 433-446

Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Mehta, R.G.; Moon, R.C.; Pezzuto, J.M. (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-220

King, R.E.; Kent, K.D.; Bomser, J.A. (2005): Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chem. Biol. Interact.* 151, 143-149

Klein, C.B.; King, A.A. (2007): Genistein genotoxicity. Critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 1-11

Kruk, I.; Aboul-Enein, H.Y.; Michalska, T.; Lichszteld, K.; Kładna, A. (2005): Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 20, 81-89

Linden, A.; Gülden, M.; Martin, H.J.; Maser, E.; Seibert, H. (2008): Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicology in Vitro* 22, 1371-1376

Makino, N.; Mise, T.; Sagara, J. (2008): Kinetics of hydrogen peroxide elimination by astrocytes and C6 glioma cells. Analysis based on a mathematical model. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 927-936

Mercer, L.D.; Kelly, B.L.; Horne, M.K.; Beart, P.M. (2005): Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem. Pharmacol.* 69, 339-345

Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickanaité, E.; Segura-Aguilar, J. (1999): Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1-2), 107-116

Michels, G.; Wätjen, W.; Weber, N.; Niering, P.; Chovolou, Y.; Kampkötter, A.; Proksch, P.; Kahl, R. (2006): Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology* 225, 173-182

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 2 (4), 152-159

Robaszekiewicz, A.; Balcerzyk, A.; Bartosz, G. (2007): Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol. Int.* 31, 1245-1250

Rubiolo, J.A.; Mithieux, G.; Vega, F.V. (2008): Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* 591, 66-72

Russo, G.L. (2007): Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* 74, 533-544

Rüweler, M.; Anker, A.; Gülden, M.; Maser, E.; Seibert, H. (2008): Inhibition of peroxide-induced radical generation by plant polyphenols in C6 astrogloma cells. *Toxicology in vitro* 22, 1377-1381

Sasaki, N.; Toda, T.; Kaneko, T.; Baba, N.; Matsuo, M. (2003): Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem. Biol. Interact.* 145, 101-116

Sergedienė, E.; Jönsson, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Rietjens, I.M.C.M.; Čėnas, N. (1999): Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Letters* 462, 392-396

Starke, P.E.; Farber, J.L. (1985): Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 260 (18), 10099-10104

Sun, A.Y.; Simonyi, A.; Sun, G.Y. (2002): The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic. Biol. Med.* 32 (4), 314-318

Vroegop, S.M.; Decker, D.E.; Buxser, S.E. (1995): Localization of damage induced by reactive oxygen species in cultured cells. *Free Radic. Biol. Med.* 18 (2), 141-151

Watzl, B.; Rechkemmer, G. (2001): Basiswissen aktualisiert: Flavonoide. Ernährungs-Umschau 48, Heft 12, 498-502

Willett, W.C. (1994): Diet and health: what should we eat? Science 264, 532-537

Zielińska, M.; Gülden, M.; Seibert, H. (2003): Effects of quercetin and quercetin-3-O-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 47-53

7 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. E. Maser für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes im Institut bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Seibert für die sehr gute Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit und Frau S. Mörchel, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und somit einen großen Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Außerdem danke ich Frau A. Müller für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft nicht nur im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken, vor allem bei meinen Eltern, die mich während meines Medizinstudiums in jeder Hinsicht mit Geduld und Liebe unterstützt haben sowie bei meinen Freunden, auf deren Hilfe und Unterstützung ich immer zählen kann.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maria Luise Kuziw
Geburtsdatum: 10.10.1981
Geburtsort: Königshütte / Polen

Schulbildung

1988 - 1989	Grundschule, Königshütte / Polen
1989 - 1990	Grundschule, Sankt Augustin
1990 - 1992	Grundschule, Wilhelmshaven
1992 - 1994	Orientierungsstufe Franziskusschule, Wilhelmshaven
1994 - 2001	Gymnasium Cäcilien-schule, Wilhelmshaven

Hochschulstudium

10/2001 – 05/2008	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel
2003	Ärztliche Vorprüfung
02/2006 – 07/2006	Auslandssemester: Universidad de Alcalá / Spanien
02/2007 – 01/2008	Praktisches Jahr: Westküstenklinikum Heide, Klinik für Chirurgie Diakoniekrankenhaus Flensburg, Klinik für Innere Medizin Universitätsklinikum Kiel, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
2008	Ärztliche Prüfung, Approbation als Ärztin

